

N° d'ordre : 203

THESES

présentées
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON
pour obtenir
le grade de DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES
par

Paule CUEILLERON-FLAMENS

Attachée de Recherches C. N. R. S.

PREMIÈRE THÈSE

**Bacillus coagulans A.T.C.C. 11.369 ; étude de
quelques variations de son équipement enzymatique
en fonction des conditions aérobies
ou anaérobies de sa croissance**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Soutenues le 20 Mars 1954
devant la Commission d'examen**

M. D. CORDIER
M. R. KÜHNER
Mme P. CHAIX

Président
Examineur

»

1954

T H E S E S

présentées

à la Faculté des Sciences de Lyon

pour obtenir

le Grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Paule CUEILLERON-FLAMENS

Attachée de Recherches C.N.R.S.

---ooOoo---

1^{ère} Thèse : *Bacillus coagulans* A.T.C.C. 11.369; étude de quelques variations de son équipement enzymatique en fonction des conditions aérobies ou anaérobies de sa croissance.

2^{ème} Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 20 Mars 1954 devant la Commission d'Examen :

M. D. CORDIER

Président

M. R. KÜHNER

Examineur

Mme P. CHAIX

"

---oooOOOooo---



UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyen Honoraire

M. LONGCHAMBON.

Professeurs Honoraires

MM. VESSIOT Membre de l'Institut	SIRE
DULAC	FROMAGEOT
VANEY	LOCQUIN Correspondant de l'Institut
MEUNIER L.	DE LARAMBERGUE

Doyen

M. DOUIN.

Assesseur

M. EYRAUD.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
DOUIN	Botanique
SOLLAUD	Zoologie
DEJARDIN	Physique Générale
EYRAUD	Calcul différentiel et intégral
THIBAUD	Physique atomique
THORAL	Géologie
DOEUVRE	Chimie organique
CORDIER	Physiologie
KÜHNER	Botanique
PRETTRE	Chimie Industrielle
AUMERAS	Chimie
COURTY	Chimie-Physique
PARIS	Chimie minérale
MALECOT	Mécanique rationnelle
COLONGE	Chimie
BERNARD	Physique

VIRET	Géologie
MEUNIER P.	Chimie biologique
JANIN	Physique
MENTZER	Chimie biologique

Maître de Conférences honoraires

M. MOURRIER DES GAYETS

Maîtres de Conférences

MM. MOUSSA	Physique
NIGON	Zoologie
Mme CHAIX	Physiologie
MM. WAUTIER	Zoologie
BRACONNIER	Mathématiques
CUEILLERON	Chimie
SCHNELL	Botanique
BOUTILIER	Minéralogie

Chargés de cours complémentaires

MM. DUFAY	Astronomie et Physique supérieure
PIERRON	Chimie
GARRIGUES	Botanique
Mme FIASSON	Zoologie
MM. GAUTHIER H.	Géologie
MESNARD	Physique
PENNANEAC'H	Mathématiques
GAUTHIER J.	Chimie
STRIFFLING	Météorologie
PELLETIER	Géologie
MAZENOT	Géologie
MURET	Botanique
FIASSON	Zoologie
TRANCHAT	Physique

Secrétaire

M. ROUX.

Le présent travail a été exécuté au Laboratoire de Chimie Physiologique (Annexe de la Chaire de Physiologie Générale) de la Faculté des Sciences de Lyon, sous la direction de Madame P. CHAIX (Maître de Conférences). C'est elle qui m'a fixé le sujet de cette thèse et qui n'a cessé de me guider avec une constante sollicitude dans sa réalisation. Je tiens à la remercier ici tout particulièrement.

Je remercie également le Professeur René BERNARD qui a bien voulu mettre à notre disposition le microscope électronique de son service et ses élèves M. Emile PERNOUX, Chargé de Recherches C.N.R.S., et M. Marcel SALVAT, Ingénieur C.N.R.S., qui se sont chargés de réaliser les micrographies électroniques de nos préparations bactériennes. Ma reconnaissance s'adresse aussi à tous les collaborateurs du laboratoire, spécialement à Gaston RONCOLI, Collaborateur Technique C.N.R.S., et à Marie-Camille GAYDON dont l'aide m'a été, à maintes reprises, précieuse.

Je n'oublie pas que ces études m'ont été rendues possibles grâce aux allocations de Boursière puis d'Attachée de Recherches qui m'ont été accordées durant ces dernières années par le Centre National de la Recherche Scientifique auquel je conserve une très vive gratitude.

Que Monsieur le Professeur Daniel CORDIER qui a bien voulu accepter de présider le jury de cette thèse et Monsieur le Professeur Robert KÜHNER qui a bien voulu accepter d'en faire partie, trouvent ici l'expression de mes sentiments très respectueusement reconnaissants.

-oooOooOoo-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552307_0089

INTRODUCTION

Bacillus coagulans appartient au groupe des "Thermophilic Aerobic Sporeforming Bacteria". (1) (45) (64) (37). Cet organisme, un peu moins thermophile que *B. stearothermophilus* (température maximum 65-70°) supporte cependant des températures allant jusqu'à 60-65°. Il a été décrit, pour la première fois, par HAMMER en 1915 (40) (59); N.R. SMITH, R.C. GORDON & F.E. CLARK (64) le confondent avec *Bacillus dextrolacticus* décrit par WERKMANN & ANDERSEN (76) (2) en 1938-1940.

Les expériences rapportées, dans le présent travail, ont été réalisées soit avec *B. coagulans* A.T.C.C. 10.545, soit, le plus souvent, avec une nouvelle souche (souche C) de *B. coagulans* dont l'identification, conduite d'après les méthodes proposées par la "Standard Descriptive Chart", est décrite au chapitre II. Cette souche C est actuellement classée à l'"American Type Culture Collection" sous le nom de *Bacillus coagulans* N° 11.369, Strain C (non coagulating strain).

Les essais mentionnés au chapitre III ont montré que *B. coagulans* présente une aptitude sensiblement égale à se multiplier dans un milieu de culture riche, donné, que ce milieu soit parfaitement saturé d'air (aérobiose), imparfaitement saturé d'air (semi-anaérobiose) ou pratiquement exempt d'oxygène (anaérobiose). Il apparut donc que *B. coagulans* constituait un matériel particulièrement favorable à l'étude si importante des variations de l'équipement enzymatique d'une cellule vivante en fonction des conditions aérobies ou anaérobies de sa croissance.

PASTEUR a, le premier, observé que les mécanismes de respiration et de fermentation pouvaient être interchangeables. Il mentionne notamment, en ces termes, la possibilité qu'a la levure de se servir, dans certaines conditions, soit des processus de respiration, soit des processus de fermentation, pour assurer sa multiplication : "la levure semée dans un milieu privé d'oxygène ne se développe qu'autant que cette levure est dans un état de grande jeunesse"; "pour se multiplier dans un milieu fermentescible hors de toute présence de gaz oxygène les cellules de levure doivent être extrêmement jeunes". (53)

Cette propriété, commune à un grand nombre de cellules, de se multiplier en présence ou en l'absence d'air, fut mieux comprise après que WIELAND & THUNBERG eurent établi que les réactions essentielles productrices d'énergie intervenant au cours de la respiration ou de la fermentation sont, dans les deux cas, des réactions d'oxydo-réduction.

Toutefois, le fait que l'oxygène moléculaire, au cours des processus respiratoires, ne joue pas le rôle d'un simple accepteur d'hydrogène, mais subit une activation donnant à la chaîne des oxydo-réductions respiratoires une très nette individualité, a été particulièrement bien mis en évidence par les expériences de REID en 1931 (57).

A l'heure actuelle, on sait que certains organismes sont capables de vivre en mettant en jeu, soit exclusivement des réactions de fermentation, soit exclusivement des réactions de respiration, soit simultanément les deux types de réactions, on sait aussi que les processus respiratoires apparaissent comme énergétiquement les plus économiques et, que la dégradation en aérobiose des molécules hydrocarbonées implique une chaîne de réactions, soit partiellement identiques, soit partiellement distinctes de celle de la voie anaérobie. Cependant beaucoup de données manquent encore en ce qui concerne les rapports et la signification profonde de ces deux modes de vie.

En vue d'apporter une contribution à l'étude de cet important problème, il nous a paru intéressant de rechercher et de mesurer quelques activités enzymatiques chez un organisme aérobic facultatif tel que *B. coagulans*, ce bacille ayant été cultivé, non pas dans des conditions de semi-aérobiose mal définies, mais dans des conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose portant au maximum ou au minimum le fonctionnement de son système respiratoire. Les cultures anaérobies, très difficiles à réaliser, ont été obtenues grâce à l'emploi d'azote gazeux hautement purifié (Azote "R") préparé par l'usine de Lyon de la Société "L'Air liquide" et garanti comme contenant au maximum 3.10^{-5} d'oxygène.^(°)

Les recherches et mesures d'activités enzymatiques ont été faites à l'aide de masses bactériennes non proliférantes, "resting cells" (56),

(°) *B. subtilis*ensemencé sur un milieu convenable, en atmosphère d'azote "R" dans les mêmes récipients que ceux utilisés pour *B. coagulans*, ne se multiplie pratiquement pas.

en solution tampon bicarbonate, soit en atmosphère de CO_2 , soit en atmosphère ($50\% \text{CO}_2 + 50\% \text{O}_2$).

Le chapitre III se rapporte à l'étude de la formation d'acide lactique soit à partir des réserves endogènes, soit à partir du glucose présent dans le milieu.

Dans le chapitre IV sont décrits la mise en évidence, chez *B. coagulans*, d'une cystéine-désulphydrase, l'étude des caractères et des variations quantitatives de ce ferment, en fonction des conditions aérobies ou anaérobies des cultures ou des essais, les rapports existant entre la synthèse de ce ferment et les apports exogènes en pyridoxine.

Le chapitre V est consacré à la recherche des cytochromes et de la catalase chez *B. coagulans* cultivé en aérobiose, en semi-aérobiose ou en anaérobiose. Aucune étude manométrique sur la respiration de *B. coagulans* n'a été entreprise, même à des températures favorables à ces mesures, et ceci pour plusieurs raisons : tout d'abord *B. coagulans*, en présence de divers substrats, donne lieu à une formation si importante d'acide qu'aucun tampon phosphate, utilisé aux concentrations habituelles, ne résiste. D'autre part, les conditions de variations du système respiratoire de *B. coagulans* avaient besoin d'être établies, avant de commencer une telle étude, qui fera peut-être l'objet d'un travail ultérieur, quand le problème de la stabilisation du pH sera résolu.

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus fait l'objet dans le chapitre VI d'une discussion portant principalement sur les questions suivantes :

- Sur quoi est fondée la classification de la souche C, organisme ne coagulant pas le lait, parmi les *B. coagulans* ?
- Dans quelle mesure *B. coagulans*, souche C, est-il un organisme homolactique ?
- En quoi se distingue-t-il des bactéries lactiques vraies ?
- En quoi les systèmes de désulfuration de *B. coagulans* s'apparentent-ils ou se distinguent-ils des systèmes de désulfuration des autres microorganismes ?
- Les ferments hématiniques, cytochromes et catalase, sont-ils adaptatifs ? Les cytochromes subissent-ils une évolution en fonction du temps ?
- La présence du système respiratoire hématinique influence-t-elle les synthèses protoplasmiques ?

- L'inaptitude des cultures anaérobies à synthétiser les cytochromes correspond-elle à une inaptitude à synthétiser le noyau hématinique ?
- Comment l'existence d'un système respiratoire hématinique, chez *B. coagulans*, cultivé en aérobiose, est-elle compatible avec la mise en jeu du système de désulfuration fonctionnant, d'une façon plus active, en aérobiose qu'en anaérobiose ?

L'ensemble des recherches présentées dans ce travail, montre que, sous l'influence des variations du seul facteur oxygène, les cellules de *B. coagulans*, tout en conservant des possibilités à peu près constantes de leur pouvoir de synthèse protoplasmique globale, subissent des changements de leur équipement enzymatique, se manifestant d'une façon particulièrement radicale (dans les limites des recherches effectuées) en ce qui concerne les ferments hématiniques.

CHAPITRE I

- MATERIEL & TECHNIQUES -

A - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES -

- 1°) *Bacillus coagulans* (souche C non coagulante) A.T.C.C. 11.369.
Souche identifiée par nous-mêmes au cours de ce travail.
Température d'incubation utilisée = 50°^(°).
- 2°) *Bacillus coagulans* F 5; souche voisine de la précédente, non classée à l'A.T.C.C. Température d'incubation utilisée = 50°^(°).
- 3°) *Bacillus coagulans* A.T.C.C. 10.545. Souche communiquée par Dr. F.A. WEISS (Curator American Type Culture Collection).
Température d'incubation utilisée = 50°^(°).
- 4°) *Thermobacterium Delbrücki* (Tbm Delbrücki) encore désigné sous le nom de *Thermobacterium cereale* (Orla-Jensen) issu d'une souche lyophilisée communiquée par le Professeur A.J. KLUYVER de DELFT.
Température d'incubation utilisée = 45°.
- 5°) *Streptobacterium casei* (Sbm casei) issu d'une souche lyophilisée communiquée par le Professeur A.J. KLUYVER de DELFT. Ce microorganisme est identique à *Lactobacillus casei* A.T.C.C. 9.595.
Température d'incubation utilisée = 37° - 38°.

B - MILIEUX DE CULTURE -

D'une façon générale la stérilisation des milieux de culture est obtenue par autoclavage d'une demi-heure à la température de 120°. Dans tous les cas le carbonate de calcium introduit dans les milieux a subi une stérilisation au "four Pasteur", une heure à 170°.

(°) Cette température d'incubation élevée présente certains inconvénients en ce qui concerne le réglage des étuves et des bains-marie, la lubrification des rodages.

a) Milieux de conservation des souches.

1°) Milieu S, solide, à l'agar incliné : glucose 5 %; peptone pancréatique "Prolabo" 1%; "Bacto Yeast Extract Dehydrated Difco" 0,5 %; CO_3Ca 2 %; agar "Merck" 4 %. Ce milieu est utilisé pour la conservation des B. coagulans, (souches C, F 5 et 10.545) incubation à 50° pendant 17 heures; repiquage tous les mois.

La forte teneur en agar de ce milieu S est nécessitée par la température d'incubation élevée.

2°) Milieu liquide L : extrait de levure (obtemu à partir d'une suspension de levure de boulangerie à 20 %, autoclavée 3 heures à 120° puis décantée et filtrée), additionné de glucose 2 %, de "Bacto Yeast Extract Dehydrated Difco" 0,5 % et de CO_3Ca 2 %. Ce milieu est utilisé pour la conservation de Tbm Delbrücki et de Sbm casei.

b) Précultures.

Les précultures sont faites :

- soit sur milieu S décrit ci-dessus
- soit sur milieu L " "
- soit sur milieu liquide I préparé de la façon suivante :

500 ml d'eau distillée sont portés à l'ébullition et additionnés de 65 grammes de farine de riz. Le mélange amené à une température de 60° est additionné de 1 gr. d'amylase dissoute dans 10 ml. d'eau froide. Le tout, ayant été agité, est maintenu pendant environ une heure à l'étuve à 50°; on ajoute enfin 10 grammes de pâte d'acides aminés et 40 grammes de carbonate de calcium.

c) Milieu II utilisé pour l'obtention des bactéries en grandes masses.

- mélange A : glucose	200 g.
carbonate de calcium	80 g.
eau	3.500 l
- mélange B : Difco	20 g.
Peptone	8 g.
Eau	0.5 l

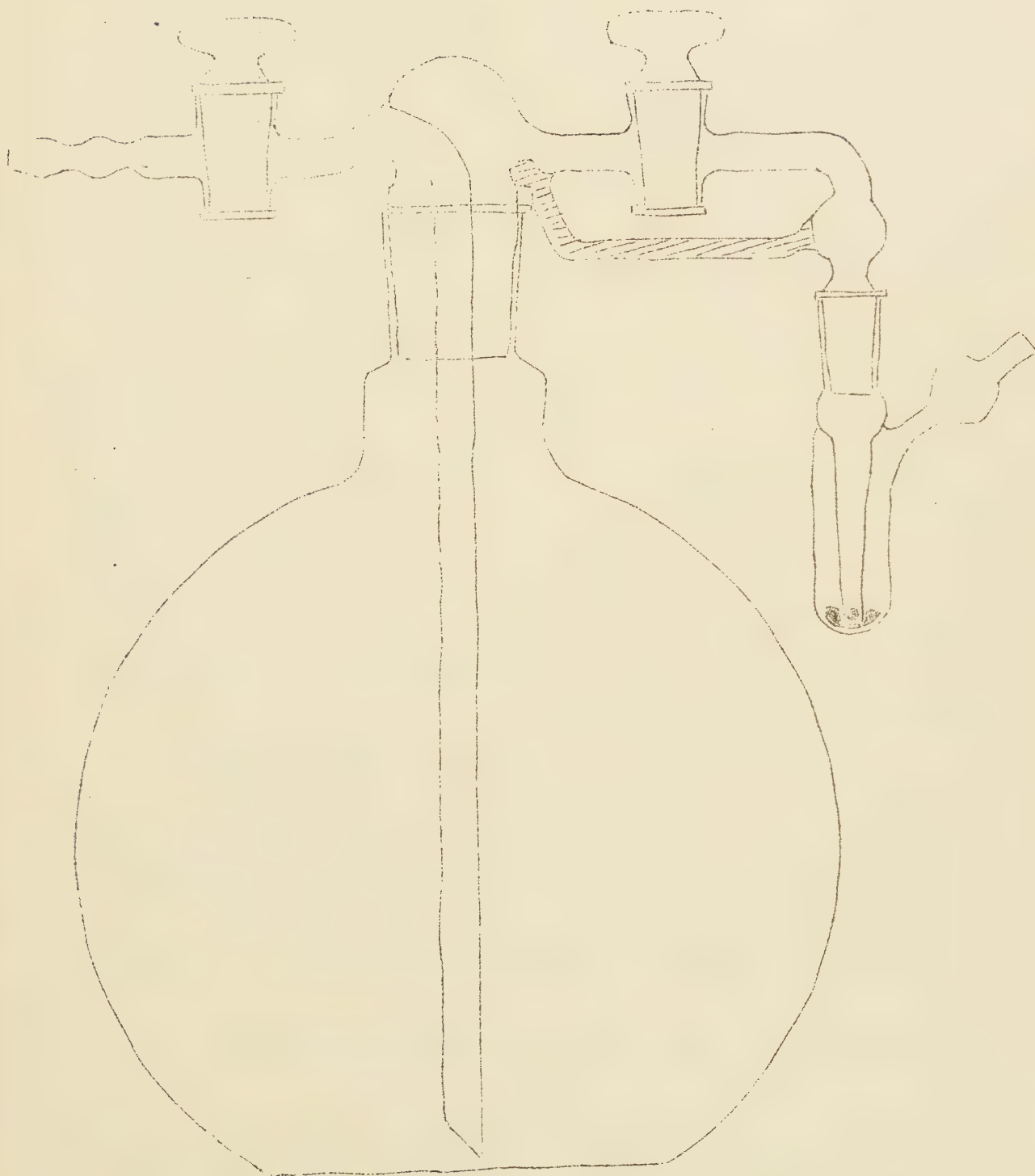


Figure 1 - Ballon spécial pour cultures anaérobies (échelle 1/2).

Les mélanges A et B, stérilisés séparément 30 minutes à 120° sont mélangés immédiatement avant l'ensemencement.

d) Réalisation des conditions d'anaérobiose, de semi-aérobiose et d'aérobiose des cultures en vue d'obtenir de grandes masses bactériennes.

1°) Cultures anaérobies : Deux ou quatre litres de milieu II sont placés dans un ballon de six litres fermé par un bouchon en verre rodé (fig.1), muni de deux tubulures dont une seulement plonge dans le liquide. La saturation gazeuse est effectuée, avant l'ensemencement, par passage pendant 20 minutes, d'un courant d'azote dont la pureté est garantie par la Société "L'Air liquide" (azote R) contenant au maximum 3.10^{-5} d'oxygène^(°). L'ensemencement est fait, sous courant gazeux, en soulevant le bouchon rodé. Aussitôt après, la tubulure ne plongeant pas dans le liquide de culture est mise en liaison, par un rodage, avec une soupape au mercure et le barbotage est poursuivi durant au moins 15 minutes encore avant la mise à l'étuve. La soupape au mercure est destinée à éviter les excès de pression survenant au cours de l'incubation par suite du déplacement du gaz carbonique à partir du carbonate de calcium au fur et à mesure que le milieu s'acidifie. Une bonne répartition du carbonate de calcium assurant une neutralisation régulière est obtenue soit grâce à quelques agitations à la main, soit par agitation mécanique continue à l'étuve.

Dans de tels essais, est réalisée une anaérobiose que l'on serait tenté d'appeler anaérobiose stricte pour les raisons suivantes :

α - la purge du ballon est suffisante dans les conditions où nous opérons puisque B. subtilis (N° 85. N.C.T.C. London), capable de pousser légèrement en atmosphère d'azote contenant environ 2% d'oxygène (azote commercial), ne pousse rigoureusement pas en atmosphère d'azote "R" dans des ballons purgés suivant les conditions que nous avons indiquées, même en présence de CO_2 (CO_2 libéré par acidification de bicarbonate de sodium).

(°) La teneur en oxygène de l'azote "R" a été contrôlée en utilisant la méthode de J.S. POWELL & P.C. JOY (55).

3) la teneur en oxygène de l'azote "R", étant au maximum de 3.10^{-5} , le calcul montre, dans le cas d'un ballon de six litres contenant quatre litres de milieu liquide, qu'au moment de l'ensemencement, l'oxygène apporté par l'azote dans le ballon correspond à environ 120 mm³. En admettant que la vitesse de respiration des bacilles ~~soit~~ pétite ($Q_{O_2} = 10$), la quantité d'oxygène présente serait respirée en une heure par 150 mg. (poids sec) de bacilles. Or nos récoltes, étant de l'ordre de 4 gr. (poids sec) pour des temps de culture de l'ordre de 18 heures, il apparaît que cet oxygène initialement présent doit être rapidement et totalement éliminé.

- si l'on suppose, d'après les travaux de O. WARBURG (74), que la vitesse de la respiration est indépendante de la pression partielle de l'oxygène, notre raisonnement est valable.

- si l'on suppose que la vitesse de respiration dépend de la pression partielle de l'oxygène (44) (60) (49), deux cas sont à envisager :

- ou bien l'abaissement de la pression partielle de l'oxygène augmente le Q_{O_2} : le raisonnement précédent est à fortiori valable

- ou bien l'abaissement de la pression partielle de l'oxygène abaisse le Q_{O_2} : la respiration est pratiquement totalement inhibée, aux très faibles pressions partielles d'oxygène éventuellement présentes.

Dans nos conditions de travail, des quantités très importantes d'acide lactique se forment au cours de la croissance aux dépens du glucose; le milieu s'acidifie et du CO₂ est libéré à partir du CO₃Ca. Cette circonstance mérite d'être soulignée car, peu à peu, à une atmosphère d'azote pur, se substitue une atmosphère contenant une forte proportion de CO₂. Nous ne savons pas dans quelle mesure la pression partielle de CO₂ retentit sur le métabolisme de B. coagulans notamment sur ses possibilités de fixation de CO₂.

2°) Cultures aérobies : Un litre de milieu II est placé dans un ballon de six litres fermé par un bouchon de caoutchouc muni de deux tubulures dont une seulement plonge dans le liquide. Après ensemencement, durant toute l'incubation, la tubulure ne plongeant pas dans le liquide est reliée à une trompe à eau, ce qui assure le renouvellement constant de l'air. Le ballon, de plus, est lui-même continuellement agité à grande vitesse dans l'étuve. L'air aspiré, pris à l'extérieur du laboratoire, traverse, avant d'arriver dans le ballon, un flacon laveur contenant une solution de MnO₄K, 0.1 N. Comme, au cours de la croissance bactérienne, dans ce milieu

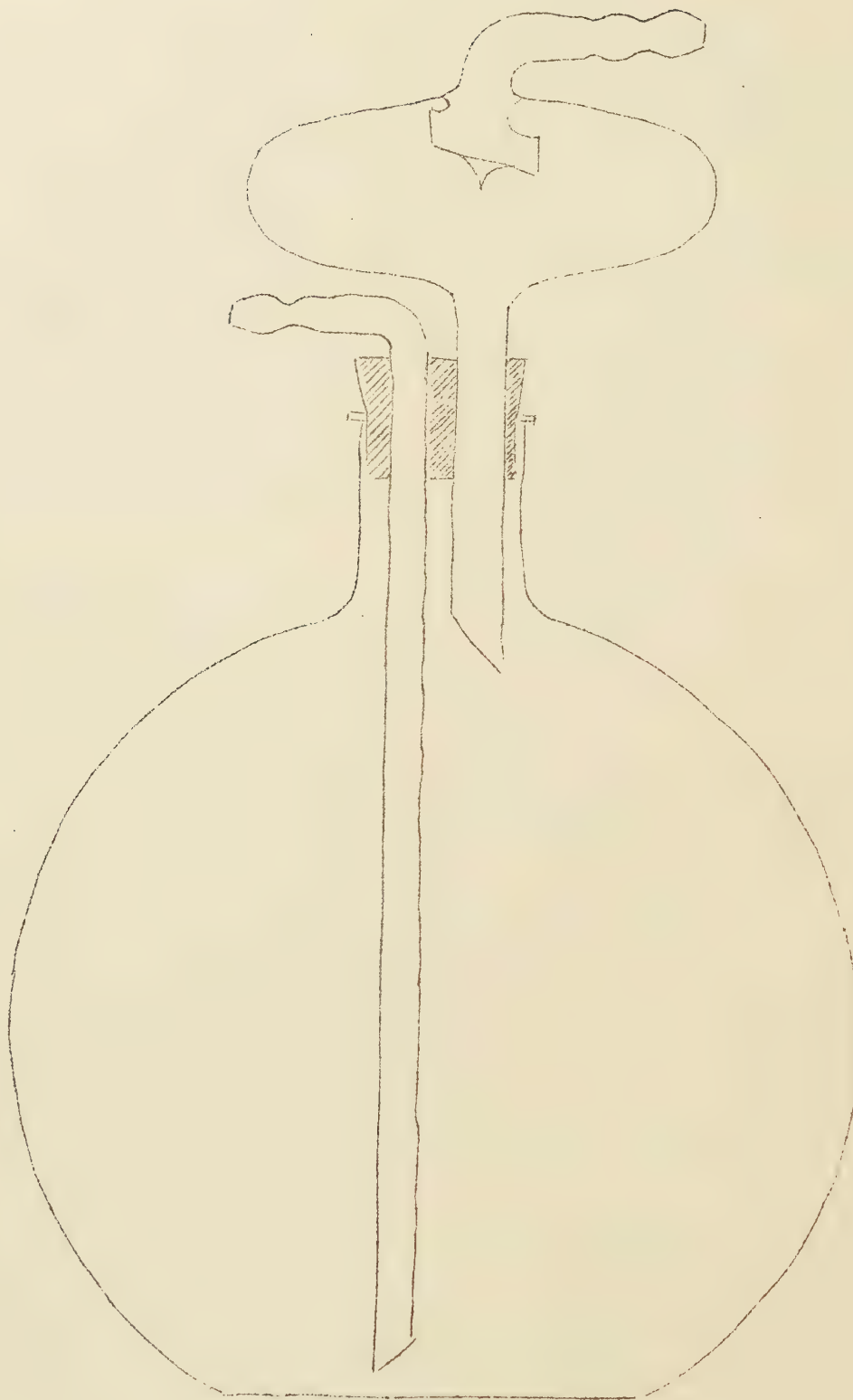


Figure 2 - Ballon muni d'une boule anti-mousse pour cultures aérobies
(échelle 1/2).

fortement agité, il se forme des mousses abondantes, il est nécessaire de placer sur le trajet de l'air vers la trompe à eau, une boule anti-mousse (cf. fig. 2). Au cours de cette croissance fortement aérobie, il se forme là aussi des substances acides qui déplacent le CO_2 du CO_3Ca . Il est certain que, dans de tels essais une partie de ce CO_2 est entraînée par la trompe, aussi, nous ne pouvons pas affirmer que nos essais aérobies et anaérobies soient rigoureusement comparables en ce qui concerne leurs teneurs en CO_2 .

3°) Cultures semi-anaérobies : Quatre litres de milieu II sont placés dans un ballon de six litres (surface de contact du liquide avec l'air, environ 4 dm^2), bouché au coton. On agite fortement le milieu après l'ensemencement, pour assurer une bonne répartition de l'ensemencement et du carbonate de calcium. La neutralisation du milieu par le carbonate de calcium est obtenue par quelques agitations plus ou moins régulières à la main au cours de l'incubation. Nous verrons, plus loin, l'importance du degré d'agitation de ces cultures sur le développement du système respiratoire des bacilles qui s'y multiplient. Dans de tels essais, les conditions sont bâtarde; nous avons voulu reprendre les conditions des cultures classiques pour pouvoir comparer nos résultats à des travaux antérieurs.

C - EXAMEN MORPHOLOGIQUE DES MICROORGANISMES.

L'examen morphologique des cellules végétatives et la recherche des spores ont été faits :

- soit par des examens microscopiques sur des préparations fixées et colorées : dans la recherche des spores on a utilisé notamment les méthodes de TRIBONDEAU (71) (72), de LOEFFLER (cf. 47), de LAYBOURN (cf. 47), de SCHAEFFER & FULTON (cf. 47).
- soit par des examens microscopiques de suspensions bactériennes entre lame et lamelle à l'aide du dispositif à contraste de phase WILD,
- soit à l'aide de micrographies électroniques de préparations sur collodion, ombrées à l'or.

D - METHODES UTILISEES POUR LA CARACTERISATION BACTERIOLOGIQUE DE LA SOUCHE C.

Toutes les méthodes utilisées sont décrites dans "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" (47).

E - PROCEDE D'ETUDE DE DIVERSES ACTIVITES FERMENTAIRES DE B. COAGULANS UTILISE SOUS FORME DE "RESTING BACTERIA" (56).

a) Récoltes bactériennes. Le carbonate de calcium est éliminé par une centrifugation d'une minute à une vitesse d'environ 1.500 tours/minute. Une nouvelle centrifugation de 25 minutes à une vitesse de 4.500 tours/minutes permet aux bacilles de se déposer sous forme d'une couche crémeuse à la surface du culot du carbonate de calcium. Il est alors relativement facile, après décantation du liquide surnageant, de mettre en suspension, dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, la quasi-totalité de la couche bactérienne sans entraîner du carbonate de calcium. La suspension bactérienne ainsi obtenue (pratiquement exempte de carbonate de calcium^(°)) est lavée à deux reprises par centrifugation dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %. La concentration en bactéries de la suspension finale, suspension-mère, à partir de laquelle seront préparés les essais fermentaires, est estimée par poids-sec, après séchage à l'étuve à 110°, jusqu'à poids constant, en tenant compte de la présence de chlorure de sodium.

b) Préparation des essais fermentaires. Les essais fermentaires sont réalisés dans des cellules en verre Pyrex antérieurement décrites (24) permettant d'opérer en atmosphère gazeuse définie et susceptibles d'être agitées, durant toute la réaction, dans un bain-marie à température constante. Ces essais fermentaires contenant de grosses masses bactériennes en suspension dans des solutions pauvres en azote ou exemptes d'azote, et la durée de ces essais étant relativement courte (une heure sauf mention spéciale), nous n'avons pas jugé nécessaire d'opérer dans des conditions rigoureusement stériles.

(°) L'absence de carbonate de calcium dans les récoltes a été vérifiée manométriquement, après acidification.

1°) Essais en atmosphère de gaz carbonique.

Le gaz carbonique que nous utilisons, fourni par la Société "carbonique liquide" de Lyon, provient de la combustion du coke et a la composition suivante :

CO ₂	99,4 % en volumes
H ₂ O	0,01% en poids
Acidité autre que celle du CO ₂	0
Alcalinité	0
Huile + Carbures	0,05 %
SO ₂	0
SH ₂	0
CO inférieur à 10 ⁻³	
pas de traces de produits nitrés.	

On introduit d'abord dans la cellule 15 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1,12 % destinée à tamponner le milieu. Les cellules sont placées au bain-marie à température constante et, sous courant de gaz carbonique, sont introduits le ou les substrats à étudier, puis, un volume connu de la suspension-mère de bacilles. Le volume liquide total de chaque essai est suivant les cas de 20 à 25 ml. et son pH est de 6,6, ce que l'on vérifie avant chaque essai par colorimétrie au bleu de bromothymol et ce qui a été vérifié une fois pour toutes au moyen de l'électrode de verre. Les rodages des cellules ayant été graissés avec une graisse^(°) supportant une température d'au moins 60°; les différents robinets sont fermés soigneusement. On considère, comme temps zéro, l'instant correspondant à l'introduction du substrat. Les essais, ainsi préparés, sont agités au bain-marie à température constante durant un temps convenable (généralement une heure). Aussitôt sortis du bain-marie, ils sont refroidis dans un bain-marie glacé et additionnés de 3 ml. de SO₄H₂ à 20 %. Le dosage des substances dont on cherche la disparition ou l'apparition est effectué sur des prises d'essai, d'après les méthodes indiquées, au paragraphe F.

Quelques essais en anaérobiose ont été réalisés, non pas en présence de tampon bicarbonate, mais en présence de tampon phosphate (PO₄Na₂H + PO₄H₂K pH = 6.6 - conc. = 0.2 M.) et en atmosphère d'azote "R".

(°) graisse Airène

2°) Essais en atmosphère (50 % O_2 + 50 % CO_2).

Ces essais sont préparés comme les précédents, à ceci près que la cellule, au lieu d'être hermétiquement close, est maintenue en communication, d'une part avec une bombe contenant le mélange gazeux (50 % O_2 + 50 % CO_2) devant barboter dans l'essai durant toute la réaction, et, d'autre part, avec deux barboteurs en Pyrex montés en série. Comme dans les essais précédents, on vérifie chaque fois, avec le bleu de bromothymol, que le pH final des essais (contrôlé une fois pour toutes à l'électrode de verre) est de 6,7 - 6,8.

Dans les essais, où l'on étudie la réaction de désulfuration enzymatique de la cystéine ou de la cystine introduites comme substrats, l'hydrogène sulfuré se fixe au fur et à mesure de sa formation dans une solution d'acétate de zinc à 4 % placée (sous un volume de 50 ml) dans chacun des barboteurs. Cette extraction continue de l'hydrogène sulfuré formé a l'avantage d'éviter son oxydation ultérieure susceptible de fausser son estimation finale.

Les mousses abondantes se formant au cours du barbotage du mélange gazeux constituent un grave inconvénient puisqu'elles sont capables d'entraîner, dans les barboteurs, des quantités non négligeables de liquide fermentaire. Cet inconvénient est particulièrement à redouter dans les essais contenant de la cystéine et au cours desquels on étudie des réactions de désulfuration. Le 2-octanol (à raison de 3 gouttes par essai de 20 à 25 ml) est un bon anti-mousse; malheureusement il exerce sur la désulfuration de la cystéine et sur la dégradation du glucose en acide lactique par *B. coagulans*, une forte inhibition (cf. tableau 21). Nous avons donc renoncé à son emploi et adopté, comme anti-mousse, à la concentration d'environ 0,001 %, un composé organo-silicique chimiquement assez inerte, le "Rhodorsil 424" (°). Il convient de tenir compte, toutefois, du fait que le "Rhodorsil" se décompose en milieu très acide en donnant des produits fortement moussants. Cette éventualité est à craindre quand, à la fin des essais fermentaires, on bloque la réaction par addition d'acide sulfurique.

(°) fabriqué par les Etablissements "Rhône-Poulenc".

F - IDENTIFICATIONS CHIMIQUES ET DOSAGES -

1°) Dosages du glucose :

Méthode de SHAFFER & HARTMANN (61) modifiée par STILES, PETERSON & FRED (68).

Les corps bactériens présents dans les essais fermentaires sont éliminés par centrifugation.

Bien entendu les dosages de glucose sont perturbés, d'une façon importante, quand les essais fermentaires contiennent d'autres substances réductrices, telles que cystéine ou glutathion. Pour doser le glucose dans les essais contenant de la cystéine, on a essayé d'éliminer la cystéine par le procédé au cadmium indiqué par DUMAZERT (27). Dans certains cas, on s'est contenté de corriger le résultat du dosage du glucose, sur les essais contenant glucose + cystéine, en tenant compte du pouvoir réducteur d'un essai témoin, exempt de glucose contenant de la cystéine à une concentration voisine de celle des essais réels.

L'acide trichloracétique perturbe le dosage du glucose; c'est pour cette raison que nous avons préféré l'acide sulfurique à l'acide trichloracétique pour bloquer nos réactions fermentaires. Le dosage du glucose est impossible en présence de 2-octanol; il est possible en présence de "Rhodorsil 424" dans les essais non acidifiés en fin d'expérience.

2°) Dosages de l'acide lactique :

Méthode de FRIEDEMANN, COTONIO & SHAFFER (29) modifiée par FRIEDEMANN & GRAESER (30) et FRIEDEMANN & KENDALL (31). La présence de cystéine dans les essais ne perturbe pas le dosage, celle du 2-octanol ou du "Rhodorsil 424" non plus.

3°) Isolement de l'acide lactique sous forme de lactate de zinc :

Suivant la technique indiquée par NEUBERG & GORR (50) (51).

4°) Dosages de l'hydrogène sulfuré :

L'hydrogène sulfuré apparaissant dans des essais fermentaires réalisés en récipients clos est quantitativement déplacé, à l'aide d'un courant de gaz carbonique, dans une solution d'acétate de zinc contenue dans un barboteur; le sulfure de zinc formé est dosé par iodométrie, dans les conditions habituelles. Dans le cas d'essais fermentaires comportant un passage continu de gaz, l'hydrogène sulfuré, en passant dans les barboteurs

contenant de l'acétate de zinc, est transformé au fur et à mesure de sa formation en sulfure de zinc; l'iodométrie est faite sur les liquides contenus dans les barboteurs.

5°) Dosages de la catalase :

L'activité catalasique de *B. coagulans* a été mesurée d'après la méthode de VIRTANEN mentionnée par A. BERTHO (7).

G - PROCEDES D'ETUDE DES CYTOCHROMES -

La présence des cytochromes a été déterminée par des examens spectroscopiques :

- soit examens spectroscopiques directs de la récolte bactérienne (obtenue par une centrifugation finale de 20 minutes à 5.000 tours/mimute), placée sous forme de pâte dans un anneau de SCHEIBE entre deux lames de verre ou de plexiglass. De telles préparations, dont l'épaisseur est de 2,5 mm, sont examinées avec le spectroscope de poche ZEISS ou avec le spectroscope à réversion de HARTRIDGE.
- soit examens spectroscopiques de la récolte bactérienne traitée par l'hydrosulfite de sodium et par la pyridine, dans les conditions précédemment décrites (20) afin de transformer les cytochromes en hémochromes de pyridine correspondants, dont le spectre est généralement beaucoup plus accentué que celui des cytochromes eux-mêmes.

Les préparations traitées ou non par l'hydrosulfite de sodium et la pyridine sont examinées soit à la température ordinaire soit à la température de -192° , après immersion dans de l'azote liquide pendant 7 minutes cf. (43); l'épaisseur des préparations utilisées dans ce dernier cas est de 1 mm car, à d'aussi basses températures, les spectres sont fortement accentués.

CHAPITRE II

- ETUDE BACTERIOLOGIQUE ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE C -

Pour procéder à l'identification de la souche C nous avons adopté des méthodes recommandées dans le "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" (47).

Les réponses aux questions de la "Standard Descriptive Chart" sont réunies dans le tableau 1 (pages 18 à 21).

Il convient de faire à leur propos, un certain nombre de remarques.

1°) Caractères morphologiques; sporulation.

Les bacilles se présentent, généralement, sous forme de bâtonnets 0,6 à 0,8 μ x 3 à 6 μ , isolés, ou en chaînettes de trois à quatre articles. L'examen des bacilles, après fixation et coloration, montre la présence de granulations de volutine. La forme et la taille des bacilles varient, non seulement, avec l'âge de la culture mais aussi avec la composition du milieu.

Dans les cultures liquides de même âge (20 heures), les formes varient avec le degré d'aération de la culture :

- en aérobiose et en semi-aérobiose, bâtonnets parfaitement rectangulaires,
- en anaérobiose, bacilles de plus petite taille, aux extrémités plus arrondies, groupés le plus souvent en chaînettes; quelques bacilles longs légèrement incurvés.

Les cultures sur milieu solide S contiennent aussi des bacilles de forme rectangulaire; ils sont, en général, beaucoup plus longs que dans le cas des milieux liquides et les granulations de volutine sont moins abondantes.

Sur les milieux riches, les variations de pH entre 6.6 et 4, exercent peu d'influence sur la forme des bacilles. La présence de tampon phosphate 0,2 M est, également, sans influence sur la forme des cellules. Sur les milieux pauvres (cf. milieux synthétiques utilisés dans l'étude des exigences nutritives chapitre II, appendice), il existe de grandes variations morphologiques.

Tableau 1

Auteurs	Bacillus coagulans		Bacillus dextralacticus		Souche C	
	HAMMER B.W. (Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bul. 19 (1915) 119)		WERKMAN C.H., ANDERSEN A.A. J. Bact. 35 (1938) 69 (Iowa State Coll. J. Sci. 14 (1940) 187)		P. CHAIX & P. FLAMENUS (B.B.A. 8 (1952) 38) A.T.C.C. 11.369 B.coagulans (Non - coagulating strain)	
Origine	Contamination de lait évaporé provoquant une coagulation		Contamination d'un milieu : farine de malt, glucose, CO ₂ Ca, autoclavé 25 min. à 10 "pounds".		Souche provenant d'une ancienne collection bactériologique.	
Températures d'incubation	optimum variant entre 45° et 60°; pousse nulle ou faible à 25°.		optimum 45° à 63°; pousse à partir de 20°.		pousse bien entre 45° et 55°; température des essais; 50°.	
Cellules végétatives :	0,5 à 0,9 x 2,5 à 3 μ bâtonnets ressemblant à B. subtilis; spores terminales; cellules mobiles flagelles péritriches		0,6 à 0,9 x 3 à 8 μ en général mais dimensions très variables suivant le milieu, pouvant atteindre en longueur 50 et 150 μ . bâtonnets arrondis aux extrémités, isolés, en paires ou en chaînettes. cellules mobiles flagelles péritriches		0,6 à 0,8 x 3 à 6 μ en général mais dimensions très variables suivant le milieu bâtonnets arrondis ou tronqués aux extrémités, isolés, en paires ou en chaînettes. cellules mobiles flagelles	
Gram	positif peut devenir négatif		généralement positif peut devenir négatif sur certains milieux.		généralement positif peut devenir négatif sur certains milieux	
Spores	cylindriques, terminales ou subterminales, existant au bout de 24 heures d'incubation.		ovales, terminales ou subterminales.		ovales, terminales, résistant parfois à un autoclavage de 30 minutes à 120°; présentes dans les cultures anciennes, notamment sur milieu de Smith.	
Forme des colonies	petites, rondes, régulières		circulaires, convexes, de 1 à 3 mm de diamètre		en général circulaires, ponctiformes, en relief, butyreuses, blanchâtres.	
Croissance sur agar nutritif incliné	faible à modérée; culture plate, rugueuse		- aérobiose: culture peu abondante, filiforme, légèrement en relief, opaque, brillante, lisse, butyreuse. - anaérobiose: pas de croissance			

Croissance sur agar nutritif glucosé incliné	abondante; culture lisse, humide	- séroblase: luxuriante - anaérobiose: modérée	croissance modérée au bout de 20 heures; culture filiforme, brillante, opaque, butyreuse, en relief, bords ondulés.
Piqûre dans l'agar	-	- sans glucose: croissance à la partie supérieure de la piqûre et surtout à la surface. - avec glucose: croissance jusqu'au fond de la piqûre	sur milieu glucosé, croissance à la surface et jusqu'au fond du tube.
Bouillon nutritif	croissance modérée uniforme suivie de sédimentation	croissance modérée; sédimentation modérée.	
Bouillon nutritif glucosé	forte croissance; pH s'abaissant à 4,9 ou 4,4 après 7 jours.	croissance forte; pH s'abaissant jusqu'à 4,06.	trouble important après 20 H. à 50°. (en présence de CO_2 , Ca^{++} ; odeur d'acide lactique.)
Réaction de Voges-Proskauer	positive	positive	positive (essai en croissance) négative (essai en masses non proliférantes)
Catalase	non recherchée	positive	positive
Attaque des citrates	0	0	0
SH_2	non recherché	(agar à l'acétate Pb ou citrate Fe)	positive (essais en masses non proliférantes; $\text{a}_{\text{SH}_2} = 1$ à $2\mu\text{g.}$)
Indole	non recherché	0	0
Nitrites à partir des nitrates	0 en général, mais + pour deux souches	positive	0
Hydrolyse de la gélatine	0 en général + légèrement pour une souche	(essai à 42°)	0
Lait tournolesolé	réduit; puis coagulation avec anneau rouge en surface (4 à 8 jours à 37° et 2 à 4 jours à 50°); pas de protéolyse apparente	réduction rapide coagulation en 9 à 12 H. caillot différé dans certaines conditions.	pas de réduction pas de coagulation après 10 jours à 50°.

Tableau 1 (suite)

Test de fermentation	B. coagulans		B. dextrolacticus		S o u c h e		
	(essais en croissance)		(essais en croissance)		(essais en croissance)	(essais avec des masses bactériennes)	
				agar nutritif	milieu liquide		
arabinose	O en général	+	+	O	-	O	
rhamnose	-	+	+	-	O	-	
xylose	O en général	+	+	-	-	O	
glucose	+	+	+	+	+	+	
fructose	+	+	+	-	-	+	
galactose	+	+	+	+	-	+	
mannose	-	+	+	-	-	O	
lactose	+	+	+	-	-	+	
saccharose	+	+	+	+	O	O	
maltose	+	+	+	+	-	+	
tréhalose	-	+	+	-	-	+	
mélibiose	-	+	+	-	O	-	
cellobiose	-	+	+	-	+	-	
raffinose	+	+	+	-	-	-	
mélézitose	-	+	+	-	-	O ?	
amidon	+	+	+	-	O	-	
inuline	O	+	+	-	+	O ?	
dextrine	+	+	+	-	O	-	
glycogène	-	+	+	-	+	-	
glycérol	+	+	+	-	O	+	

érythrol	-	-	-	-	-	-
arabitol	-	-	-	-	-	-
mannitol	0	0	0	0	0	0
sorbitol	0 en général	+	+	+	+	+
adonitol	0	0	0	0	0	0
dulcitol	0	0	0	0	0	0
salicine	+	+	+	+	+	+
esculine	-	-	-	-	-	-
coniférine	-	-	-	-	-	-
α-méthyl-glucoside	-	-	-	-	-	-
amygdaline	-	+	+	+	+	+
pectine	-	+	+	+	+	+
inositol	0	0	0	0	0	0
sorbose	-	-	-	-	-	-

Produit de fermentation du <u>glucose</u>	(essais en croissance)	(essais en croissance)	(essais en masses non proliférantes)
acide 1 (+) lactique	acide 1 (+) lactique 94 %	acide 1 (+) lactique 100 %	
" acétique	2-3 butylène glycol		
" propionique	acétyl-méthyl-carbinol		
	diacétyl		
	acide acétique		
	alcool éthylique		
		traces	

L'aspect des cellules de *Bacillus coagulans* A.T.C.C. 10.545

se rapproche beaucoup, dans les mêmes conditions, de celui des cellules de la souche C. Nous avons noté cependant que sur milieu II, en anaérobiose pendant 20 heures à 50°, *B. coagulans* 10.545 prend une forme très particulière en longs filaments grêles ressemblant à *Sbm casei*.

- La mobilité des bacilles de la souche C bien moindre que celle de *B. subtilis* est aisément visible par examen entre lames et lamelles à l'aide du microscope à contraste de phase. Il est d'ailleurs possible, soit en appliquant la méthode d'INOUE cf. (46), soit à l'aide de micrographies électroniques, de constater la présence de flagelles à la périphérie des bacilles. (cf. Planche I).

- Spores : L'aptitude ou l'inaptitude à la sporulation est un ancien critère de classification bactériologique conservé par la "Standard Descriptive Chart" (47). Nous nous sommes donc attaché à déterminer si la souche C était capable ou non de former des spores. Certaines observations grossières rendaient la sporulation vraisemblable. En effet, des cultures sur milieu S conservées de 6 à 16 mois à la glacière à une température de plus 4° sont encore capables de donner de nouvelles cultures normales par repiquage sur milieu S et des cultures de 16 heures à 50° sur milieu L, conservées 4 et 15 jours à la glacière à plus 4°, puis portées pendant 20 minutes à une température de 80° ou pendant 10 minutes à 85°, restent aussi capables de redonner une culture normale par repiquage sur milieu L, cf. (77).

Les simples examens microscopiques après fixation et coloration n'ont pas été facilement interprétables en raison de la présence fréquente des granulations de volutine à l'intérieur des bacilles de la souche C. Ces granulations, structure non permanente des cellules bactériennes (26), sont constituées par des acides ribonucléiques. Les spores, organes de résistance, étant elles aussi, constituées en majeure partie par des acides nucléiques, la distinction entre granulations et spores est donc très mal aisée par les procédés classiques de colorations des spores, par les colorants basiques tels que vésuvine ou triamidoazobenzène (71) violet de gentiane, bleu de méthylène, vert malachite ou safranine (47).

D'après TRIBONDEAU (71) (72), la coloration au violet de gentiane phéniqué et à la vésuvine utilisée avec ou sans mordantage

au Lugol, permettrait une distinction entre granulations et spores. En fait, des essais préliminaires sur Tbm Delbrücki riche en granulations de volutine comme toutes les bactéries lactiques vraies cf. (ORLA-JENSEN 1943, (52) page 99) nous ont montré que le procédé de TRIBONDEAU permet bien de mettre en évidence, sans mordantage préalable au Lugol, les granulations, mais d'autres essais sur Bacillus subtilis en phase de sporulation ont montré que ce procédé est également capable, même sans mordantage au Lugol, de colorer les spores.

Certains auteurs recommandent l'application (à la température ordinaire ou à une température de 55 à 60° pendant peu de temps) d'acide chlorhydrique normal qui aurait la propriété de modifier l'enveloppe de la spore et par conséquent de rendre l'intérieur de la spore accessible aux colorants. Des essais sur Bacillus subtilis nous ont montré que la coloration des spores par la méthode au bleu de méthylène de LOEFFLER (47) était possible, avec ou sans traitement préalable, par l'acide chlorhydrique.

L'ensemble de ces constatations rendant très précaire l'interprétation des observations faites à partir de préparations fixées et colorées, nous avons pris le parti, pour aboutir sans ambiguïté à une conclusion, d'une part de cultiver la souche C sur un milieu pauvre particulièrement propice à la sporulation (milieu de SMITH (54)) d'autre part de rechercher les spores à l'aide du microscope électronique. Les micrographies électroniques reproduites sur les Planches I, II et III, faites sur des préparations de souche C, cultivées sur milieu solide de SMITH, montrent Planche I : une cellule végétative de forme rectangulaire typique; Planche II : deux spores au voisinage d'une cellule végétative et Planche III : une spore en train de sortir d'une cellule bactérienne vide. Les spores se distinguent nettement des cellules bactériennes par leur relief mis en évidence grâce à l'ombrage à l'or.

2°) Température optima de croissance -

L'optimum de température de croissance de Sbm casei est de 37° et celui de Tbm Delbrücki est de 45°. Le tableau 2 emprunté à un travail de R.E. GORDON & N.R. SMITH (38), montre que B. coagulans compte parmi les microorganismes les plus thermophiles. Cependant comme son optimum de température de croissance est compris entre 30° et 55°, il est classé parmi les organismes thermophiles facultatifs.

(tableau 2)

PLANCHE I



Micrographie électronique de *B. coagulans* A.T.C.C. 11.369 : une cellule végétative x 12.000, provenant d'une culture sur milieu solide de SMITH, âgée de 3 mois 1/2. (ombrage à l'or).

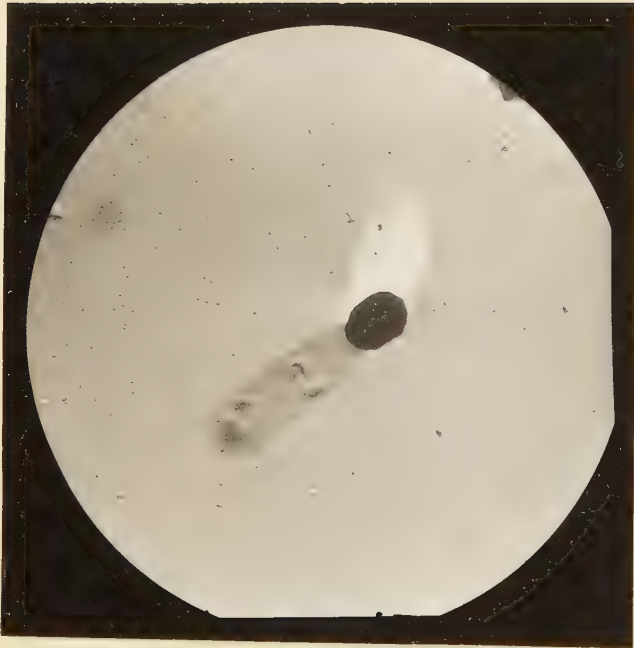
PLANCHE II



Micrographie électronique de *B. coagulans* A.T.C.C. 11.369 :
une cellule végétative et deux spores x 12.000, provenant d'une
culture, sur milieu solide de SMITH, âgée de 3 mois 1/2

(ombrage à l'or)

PLANCHE III



Micrographies électroniques de *B. coagulans* A.T.C.C. 11.369 :
cellules vides d'où émerge une spore x 12.000 provenant d'une
culture, sur milieu solide de SMITH, âgée de 3 mois 1/2.

(ombrage à l'or).

T A B L E A U 2

TEMPERATURE DE CROISSANCE DE DIFFERENTES ESPECES
DE BACTERIES AEROBIES THERMOPHILES FORMANT DES SPORES

<u>Espèces</u>	Nombre de cultures faites	Nombre de cultures croissant à différentes températures (°)								
		28°	33°	37°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
B. stearothermophilus	87	0	10	73	81	87	87	87	87	45
B. coagulans	73	53	73	73	73	72	66	23	0	
B. subtilis	154	154	154	154	150	105	17	0		
B. brevis	57	57	57	57	38	16	7	0		
B. circulans	55	55	55	51	18	6	1	0		
B. pumilus	65	65	65	65	64	43	0			
B. macerans	13	13	13	13	13	9	0			
B. cereus	50	50	50	50	23	0				
B. sphaericus ,.....	42	42	42	42	15	0				

(°) Le bain-marie a été utilisé dans tous les cas, excepté pour la température de 28°.

d'après Ruth E. GORDON & Nathan R. SMITH. (38).

Notre *B.coagulans* est également thermophile facultatif.

3°) Formation d'acide lactique à partir de glucose, galactose, lactose.

La souche C cultivée sur le milieu L en semi-aérobiose donne lieu à la formation d'acide lactique aux dépens du glucose, du galactose, mais non du lactose. Le tableau 3 donne le résultat des dosages de l'acide lactique formée dans des essais comparatifs après 54 heures d'incubation à 50°.

(tableau 3)

On voit que la vitesse de transformation du glucose est beaucoup plus grande que celle du galactose.

4°) Activité optique de l'acide lactique formé à partir du glucose.

L'expérience résumée dans le tableau 4, montre que les souches C et F 5 forment, comme *B. coagulans* de Hammer, de l'acide L (+) lactique. Il est connu (5) que *Tbm Delbrücki* forme, à partir du glucose, de l'acide D (-) lactique et que *Sbm casei* forme, à partir du glucose, un mélange des acides dextrogyre et levogyre.

(tableau 4)

5°) Coagulation du lait.

Bacillus coagulans tel qu'il a été décrit pour la première fois par HAMMER en 1915 est un organisme qui, comme son nom l'indique, provoque la coagulation du lait : le lait tournesolé coagule (avec, en surface, formation d'un anneau rouge) en 4 à 8 jours à 27°, en 2 à 4 jours à 50°, sans protéolyse apparente.

Bacillus dextrolacticus décrit en 1938-1940 par WERKMAN & ANDERSEN, et actuellement classé à l'A.T.C.C. parmi les *Bacillus coagulans*, donne lieu, lui aussi, à une coagulation du lait tournesolé en 9 à 12 heures; le caillot dans certaines conditions peut subir une digestion.

Nous nous sommes attaché à étudier comparativement l'action coagulante sur le lait, des souches suivantes : souche C, souche F 5, *B. coagulans* 10.545, *Tbm Delbrücki*, *Sbm casei*. Les tubes de lait tournesolé étaient préparés suivant la technique indiquée (47) à l'aide de lait de vache frais, non pasteurisé, écrémé par plusieurs centrifugations et autoclavé 15 minutes à 120°. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 5.

(tableau 5)

T A B L E A U 3

FORMATION D'ACIDE LACTIQUE PAR LA SOUCHE C
EN CROISSANCE SUR DE L'EAU DE LEVURE DOUBLE + CO₂ Ca
PENDANT 54 HEURES A 50°, EN PRESENCE DE DIFFERENTS SUCRES.

Conditions semi-anaérobies

Substrat	Acide lactique formé après 54 heures (en mg)
0	15,7 (°)
Glucose (0,111 M)	741,4
Galactose (0,111 M)	79,2
Lactose : (0,055 M) (°)	22,5 (°)

(°) La quantité d'acide lactique formé en présence de lactose est sensiblement la même qu'en présence de substrat.

T A B L E A U 4

ISOLEMENT SOUS FORME DE LACTATE DE ZINC DE L'ACIDE LACTIQUE

PRODUIT PAR B. COAGULANS SOUCHES C ET F 5,

ACTIVITE OPTIQUE DE CET ACIDE LACTIQUE.

Les bacilles proviennent de cultures semi-aérobies (cf. Chapitre I, Paragraphe B 3°) et sont utilisés à l'état de masses non proliférantes (souche C 3,79 g. (poids sec); souche F 5 3,67 g. (poids sec) dans des essais préparés suivant les indications données, chapitre I, paragraphe E, en atmosphère de CO₂.

Volume total des essais = 300 ml.

Desages effectués au bout de 120 minutes dans le cas de la souche C et de 270 minutes dans le cas de la souche F 5, après fermentation totale du glucose. Température = 50°.

	Souche C	Souche F 5
Acide lactique total dosé (en mg)	1470	1388
Lactate Zn déshydraté total obtenu, en mg	1920	1536
Acide lactique calculé à partir du lactate de zinc isolé en mg	1425	1138
% de ZnO obtenu après calcination du lactate de zinc déshydraté (33.44 % théorique)	33.51	34.46

Activité optique de (C₅H₇O₃)₂ Zn, 2H₂O, isolé :

Souche C : (α) D = - 6° 58' (α = - 0° 85', l = 3, c = 4.12 %, sol. aqueuse)

Souche F₅ : (α) D = - 7° 30' (α = - 0° 70', l = 3, c = 3.40 %, sol. aqueuse)

Ces expériences permettent de conclure que les souches C et F 5 transforment pratiquement la totalité du glucose en acide L (+) lactique.

T A B L E A U 5

COAGULATION DU LAIT TOURNESOLE PAR LES SOUCHES C, F 5,

B. COAGULANS 10.545; TBM DELBRÜCKI ET SBM CASEI.

Coagulation = +

Pas de coagulation = 0

<u>Souches</u>	<u>Température d'incubation</u>	<u>Durée d'incubation en jours</u>		
		1	2	12
C	{ 38°	0	0	0
	{ 50°	0	0	0
F 5	{ 38°	0	0	0
	{ 50°	0	0	0
B. coagulans 10.545 ..	50°	0	+	+
Tbm Delbrücki	{ 38°	0	0	0
	{ 45°	0	0	0
Sbm casei	38°	+	+	+
O (essais non ensemenés)	{ 38°	0	0	0
	{ 50°	0	0	0

Comme le montre le tableau, seuls ont une activité coagulante sur le lait, Sbm casei et B. coagulans 10.545. Les souches C et F 5 n'exercent aucune action coagulante.

Les principales propriétés de la souche C étant les mêmes que celles de Bacillus coagulans d'HAMMER et de Bacillus dextralacticus de WERKMAN (tableau 1), le Dr. WEISS, Curator de l'"American Type Culture Collection", n'a pas envisagé d'autre solution que de classer la souche C sous le nom de "Bacillus coagulans (non coagulating strain)".

6°) Production d'acétyl-méthyl-carbinol.

Nous plaçant dans les conditions indiquées par la Chart (méthode de VOGES PROSKAUER modifiée par SMITH (63)), nous avons constaté que la souche C donnait une réaction de VOGES PROSKAUER positive, autrement dit, était productrice d'acétyl-méthyl-carbinol. Le tableau 6 indique le comportement de 5 microorganismes dont les souches C et F 5, vis à vis de la réaction de VOGES PROSKAUER.

(tableau 6)

D'après GALE (36), la production d'acétyl-méthyl-carbinol, dans le cas d'Aerobacter aerogenes, représenterait un moyen de lutte contre l'acidité du milieu; il dériverait de l'acide pyruvique dont deux molécules se décarboxyleraient puis se condenseraient :



L'acétyl-méthyl-carbinol se formerait quand le pH du milieu s'abaisse au-dessous de 6; l'alcalinisation du milieu par contre empêcherait sa formation. Nous avons fait à propos de la souche C, les constatations suivantes :

1°) Sur le milieu liquide recommandé dans la "Chart", additionné de carbonate de calcium, la réaction de VOGES PROSKAUER n'est plus que très légèrement positive.

2°) Dans nos essais fermentaires avec des "resting bacteria", en solution de bicarbonate et atmosphère de CO₂, la réaction de VOGES PROSKAUER est négative.

Pour conclure, la souche C est capable de donner lieu à la production d'acétyl-méthyl-carbinol au cours de la dégradation du glucose, à condition que le milieu soit suffisamment acide; si le pH du milieu dépasse 6, l'acétyl-méthyl-carbinol ne se forme pas.

T A B L E A U 6

PRODUCTION D'ACETYL-METHYL-CARBINOL

Milieu de culture à la peptone de WITTE préparé suivant
les indications données par SMITH (64) p.12.

<u>Souches</u>	<u>Réaction de VOGES PROSKAUER après incubation</u>	
	<u>à 32° pendant</u>	
	<u>4 jours</u>	<u>20 jours</u>
0	0	0
Souche C	+	+++
" F 5	+ (faible)	++
Tbm Delbrücki	0	0
Sbm casei	++	+
Subtilis 3610	++	++++
(N.C.T.C. Londres)		

7°) Conclusions :

La souche C, bien que ne provoquant pas la coagulation du lait, présente tous les caractères des *B. coagulans* (1) (45) (64) : organismes sporulés, thermophiles, capables de croître en anaérobiose sur milieu glucosé : utilisant le glucose en formant de l'acide lactique droit; supportant un pH voisin de 5; formant peu ou pas d'acétyl-méthyl-carbinol; hydrolysant l'amidon; n'hydrolysant ni la gélatine ni la caséine; n'utilisant pas l'azote des nitrates et ne réduisant pas les nitrates en nitrites; n'utilisant pas le citrate. Elle a donc été classée en 1952 à l'"American Type Culture Collection" grâce aux soins du Dr. F.A. WEISS sous la rubrique suivante : A.T.C.C. 11.369 *Bacillus coagulans*, Strain C, P. CHAIX & P. FLAMENS (Biochimica et Biophysica Acta 8 (1952) 38) - Non coagulating strain.

A P P E N D I C E

A PROPOS DES EXIGENCES NUTRITIVES DE *B. COAGULANS* SOUCHE C.

Nous ne nous sommes attaché que d'une façon accessoire au problème des exigences nutritives de la souche C.

Le problème des exigences nutritives des microorganismes apparaît à l'heure actuelle encore beaucoup plus complexe qu'on ne l'avait imaginé il y a une dizaine d'années. Suivant que l'on opère dans des milieux naturels ou dans des milieux synthétiques chimiquement définis, les exigences en telle ou telle molécule ne sont pas les mêmes. Dans le cas des milieux synthétiques chimiquement définis, trois types de difficultés sont notamment à redouter :

- 1°) Absence, insuffisance ou excès de certains ions métalliques (1); certaines souches considérées jusqu'ici comme exigeantes en tel ou tel acide aminé, ou en telle ou telle vitamine, en présence d'un mélange minéral donné, cessent d'être exigeantes dans un autre milieu minéral, mieux équilibré et complété par des traces de différents ions (cobalt, zinc, bore, notamment). La concentration en ions Ca^{++} et Mg^{++} paraît particulièrement importante pour la croissance des bactéries thermophiles.

2°) Possibilité d'un antagonisme entre les dérivés optiques d'un même acide aminé; on connaît en effet des souches capables d'utiliser indifféremment les acides D et L aminés : *Lactobacillus arabinosus* utilise indifféremment la D et la L méthionine en présence de pyridoxal et pyridoxamine (14); on en connaît d'autres n'utilisant que le dérivé L et restant indifférentes à la présence du dérivé D et d'autres enfin utilisant le dérivé L et inhibées par la présence du dérivé D (54).

3°) Variation des exigences nutritives avec la température d'incubation : c'est ainsi que *E. coli* peut se passer de facteur de croissance à 35° et exiger la présence d'acide glutamique à 44° (75). On a également signalé que des écarts de température de l'ordre de 2° peuvent suffire pour faire changer les exigences de *Lactobacillus arabinosus* (11).

L'étude des exigences nutritives de *Bacillus coagulans* a déjà fait l'objet de plusieurs recherches importantes en utilisant soit des milieux complexes, soit des milieux synthétiques.

Les souches étudiées en 1940 par ANDERSEN & WERKMAN (2), sur milieux non synthétiques, exigeaient la présence de thiamine ou riboflavine, plus un facteur présent dans l'hydrolysate de caséine ou dans les extraits éthérés de levure, remplaçable par l'acide glutamique, l'arginine, la thréonine ou la cystine. Celle étudiée par CLEVERDON (22) en 1949 (*B. coagulans* N.R.S. 27) était capable de croître sur : milieu minéral + glucose + hydrolysate de caséine (supplémenté en cystine et en tryptophane) + biotine + amide nicotinique + thiamine. Celles étudiées en 1950 par KNIGHT & PROOM (45) exigeaient, l'une biotine et thiamine, l'autre biotine et riboflavine.

En 1952 M.B. ALLEN (1) a essayé de faire croître des coagulans sur un milieu synthétique contenant :

- sulfate d'ammonium : $0,1\%$ + $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$: $0,1\%$ + SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$: $0,05\%$ + glucose ou lactate ou malate : $0,1$ à $0,5\%$ -

et a constaté que beaucoup de souches incapables de croître sur ce milieu à une température de 55°, devenaient capables de croître, mais faiblement, à la température de 35 à 40°, et de plus que trois souches de *B. coagulans* incapables de croître sur ce milieu à 55°, le deviennent par simple addition de $0,3\%$ de glutamate monosodique. L'importance de la température d'incubation sur les exigences nutritives de *B. coagulans* ressort des recherches de CAMPBELL & WILLIAMS (15). Les variations des exigences en acides aminés pour 4 souches de *B. coagulans* incubées à 36°, 45° et 55° sont données dans le tableau 7.

(Tableau 7)

T A B L E A U 7

EXIGENCES NUTRITIVES DE B. COAGULANS

d'après L. CAMPBELL & O.B. WILLIAMS (15).

<u>ORGANISME</u>	Température d'incubation		
	36 C	45 C	55 C
<u>B. coagulans</u>			
2 (F)	Histidine, thiamine, biotine, acide folique.	Histidine, thiamine, biotine, acide folique.	Histidine, thiamine, biotine, acide folique.
12 (F)	Histidine, leucine, valine, thiamine, biotine, acide folique.	Histidine, leucine, thiamine, biotine, acide folique.	Histidine, leucine, thiamine, biotine, acide folique.
32 (F)	Méthionine, trypto- phane, thiamine, biotine.	Histidine, méthioni- ne, tryptophane, thiamine, biotine, acide folique .	Histidine, méthio- nine, tryptophane, thiamine, biotine, acide folique.
1039 (F)	Thiamine, biotine, acide folique.	Thiamine, biotine, acide folique.	Histidine, méthio- nine, thiamine, aci- de nicotinique, acide folique.

(F) Thermophile facultatif.

Très récemment H. BAKER, M.B. ALLEN, H.H. SOBOTKA & S.H. HUTNER cf. (1) ont utilisé le milieu minéral basal suivant, riche et équilibré, additionné de bonnes sources de carbone :

- citrate $(\text{NH}_4)_2\text{H}$: 0,25 % + PO_4KH_2 : 0,02 % + $\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,03 % + succinate de sodium, $6\text{H}_2\text{O}$: 0,3 % + glutamate monosodique : 0,4 % + Ca^{++} : 0,5 mg % + Mn^{++} : 2,0 mg % + glycérol : 0,5 % + 1 ml % d'une solution contenant :
 - 2,5 g. de "Versene" (éthylènediaminetétraacétique) + $\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$: 11 g. + $\text{SO}_4\text{Mn}, 4\text{H}_2\text{O}$: 4,61 g. + $\text{SO}_4\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 2,1 g. + $\text{SO}_4\text{Co}, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,477 g. + PO_5H_3 : 0,0571 g. + $\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,0078 g., dans un litre d'eau. -
- Ils ont obtenu la croissance de deux souches de B. coagulans.

Il ressort de ces travaux que les exigences de B. coagulans peuvent être très variables; elles ne sont probablement pas les mêmes et changent certainement suivant les souches et aussi en fonction de la composition basale du milieu; dans l'ensemble elles apparaissent toutefois assez simples.

En ce qui concerne la souche C nous n'avons réalisé qu'un petit nombre d'expériences dans les conditions suivantes. Des séries de tubes à essais ordinaires contenant chacun 0,1 g. de carbonate de calcium et 10 ml des différents milieux de culture liquides sont, après stérilisation, inoculés avec une goutte de suspension diluée de préculture (20 heures à 50° sur milieu S) de la souche C; l'incubation a lieu à une température de 50°. La croissance (dont l'évaluation est impossible par néphélométrie en raison de la présence du carbonate de calcium) est appréciée grossièrement en notant l'aspect moiré du liquide et la formation de bulles de gaz carbonique, après légère agitation du carbonate de calcium, et en examinant des prises d'essais à l'aide du microscope à contraste de phase. Nous avons considéré comme apte à assurer la croissance, tout milieu permettant d'obtenir au moins trois repiquages positifs de la souche C. Dans tous les cas, le milieu minéral de base^(o) (58) contient :

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 1 g. + PO_4HK_2 : 1 g. + $\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g. + NaCl : 0,01 g. + $\text{SO}_4\text{Fe}, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g. + $\text{SO}_4\text{Mn}, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g. + CO_3Ca : 0,02 g. + NH_4Cl : 3 g.; pour un litre de milieu. La source de carbone est dans tous les cas du glucose à la concentration de 2 %.

(Tableau 8)

(o) La teneur en magnésium de ce mélange est supérieure à celle indiquée comme limitante par GRELET (39) dans le cas de B. megatherium.

T A B L E A U 8

TENEUR EN ACIDES AMINES ET EN AZOTE

DE L'HYDROLYSAT DE CASEINE.

	<u>Acides</u> <u>aminés</u> <u>en g. %</u>	<u>Azote</u> <u>%</u>
Alanine	1,9	0,290
Arginine	3,8	1,22
Acide aspartique	6	0,631
Acide glutamique	21,8	2,07
Cystine	0,4	0,046
Glycine	0,5	0,093
Histidine	2,5	0,677
Hydroxyproline	0,2	0,021
Isoleucine, leucine	9,7	1,04
Lysine	6,3	1,21
Méthionine	3,3	0,310
Phénylalanine	3,9	0,33
Proline	8,7	1,06
Sérine	5,8	0,772
Thréonine	4,0	0,47
Tryptophane	1,2	0,165
Tyrosine	6,6	0,51
Valine	7,9	0,945

L'hydrolysat de caséine contient environ 14 % d'azote, compte tenu du fait qu'il contient aussi 2,3 % d'ammoniaque apportant 1,9 % d'azote.

Nous introduisons l'hydrolysat de caséine dans nos milieux à raison de 0,5 % - (cf. milieu de RIESEN-SPENGLER (58)).

Ce milieu de base est incapable d'assurer la croissance de la souche C. Si, (en maintenant la teneur en azote total du milieu constante), on substitue à l'azote minéral soit 0.5 % d'hydrolysate de caséine (exempt de vitamine) dont la teneur en acides aminés est donnée tableau 8, soit des mélanges synthétiques d'acides aminés, on obtient les résultats suivants (tableau 9) : bonne croissance dans le milieu de base additionné d'hydrolysate de caséine complété avec cystine 0.020 % et tryptophane 0.010 % (milieu 4) ou du mélange d'acides aminés correspondant (milieu 5) - Absence de croissance dans tous les essais où le mélange d'acides aminés est incomplet. Il convient de remarquer que sur ces milieux synthétiques le temps de croissance est plus long que sur les milieux naturels complexes tels que milieux L et S précédemment décrits au chapitre I.

(tableau 9)

La conclusion à tirer de nos expériences sur les exigences nutritives de la souche C, est que dans les conditions de température et de milieu basal utilisées elle peut se passer d'un apport en vitamines mais présente de grandes exigences en acides aminés. Toutefois notre étude est insuffisante pour pouvoir affirmer que tous les acides aminés sont indispensables à sa croissance.

T A B L E A U 9

CROISSANCE DE B. COAGULANS SOUCHE C
SUR DIFFERENTS MILIEUX SYNTHETIQUES

<u>N° du milieu</u>	<u>Hydrolysate de caséine ou acides aminés^(°) ajoutés au milieu de base</u>	<u>Nombre d'acides aminés présents</u>	<u>Nombre de repiquages positifs</u>
1	Hydrolysate de caséine ^(°) ^(°) (pauvre en cystine et tryptophane)	18	2
2	Hydrolysate de caséine + tryptophane	18	1
3	Hydrolysate de caséine + cystine	18	7
4	Hydrolysate de caséine + cystine + tryptophane	18	15
5	Tous les acides aminés aux mêmes concentrations que dans l'hydrolysate de caséine et cystine (0,02 %) + tryptophane (0,01 %)....	18	7
6	Cystine + tryptophane	2	0
7	Arginine + acide aspartique + acide glutamique + méthionine + phénylalanine + tryptophane + tyrosine	7	0
8	Milieu 7 + cystine - méthionine	7	0
9	Alanine + arginine + cystine + histidine + lysine + tryptophane + tyrosine	7	0
10	Milieu 7 + cystine	8	0
11	Milieu 7 + alanine + cystine + glycine - arginine - acide aspartique	8	0
12	Milieu 11 + hydroxyproline + proline	10	0
13	Milieu 12 + thréonine + valine	12	0
14	Milieu 13 + histidine + sérine	14	0
15	Milieu 12 + arginine + ac. aspartique + histidine + lysine - thréonine - valine	14	0
16	Milieu 14 + thréonine + valine	16	
17	Tous les acides aminés + thiamine + amide nicotinique + biotine	18	+

(°) Tous les acides aminés purs sont introduits sous la forme L, sauf méthionine, sérine, thréonine sous la forme DL, en doublant la quantité introduite.

(°)(°) "Casein hydrolysate vitamin-free" Manufactured by Ashe Laboratories
120 Victoria St - London -

CHAPITRE III

CROISSANCE DE B. COAGULANS SOUCHE C EN FONCTION DU DEGRE D'AERATION DES CULTURES; QUANTITE D'ACIDE LACTIQUE FORME PAR LES "RESTING BACTERIA" OBTENUES DANS DES DIFFERENTES CONDITIONS.

D'une façon générale B. coagulans se distingue des autres organismes thermophiles par son aptitude à se multiplier non seulement dans des conditions aérobies mais aussi dans des conditions anaérobies (1). Il nous a paru intéressant, d'une part, d'évaluer les possibilités de croissance aérobie et anaérobie de la souche C et, d'autre part, de rechercher les possibilités de transformation de différents hydrates de carbone, le glucose notamment, par la souche C à l'état de masses non proliférantes (resting cells) provenant de cultures fortement aérées, faiblement aérées ou exemptes d'oxygène.

A - EVALUATION DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE C DANS DES MILIEUX FAIBLEMENT AERES, FORTEMENT AERES OU EXEMPTS D'OXYGENE.

Une telle évaluation est difficilement très précise puisque tous nos milieux contiennent du carbonate de calcium, indispensable pour obtenir une bonne neutralisation de l'acidité produite au cours de la dégradation des hydrates de carbone. Cette présence de carbonate de calcium interdit les mesures directes de croissance par néphélométrie et rend imprécises les mesures pondérales ou par comptage. En vue de connaître l'ordre de grandeur de la croissance dans les milieux plus ou moins aérés nous avons pesé (à l'état frais ^(°) ou à l'état sec) les récoltes obtenues d'après les procédés indiqués chapitre I paragraphe E a, à partir de grands volumes de milieux de culture. Les résultats de ces mesures réunis dans le tableau 10 montrent tout d'abord que les quantités de bacilles récoltées après 12 H. d'incubation à 50° sur milieu II sont beaucoup plus grandes dans les cultures aérobies que dans les cultures anaérobies, mais qu'après 18-20 H. d'incubation ces quantités sont à peu près égales dans les cultures semi-aérobies, aérobies ou anaérobies; de plus entre la vingtième et la quarante cinquième heure, la croissance s'arrête aussi bien dans les essais aérobies que dans les essais anaérobies.

(°) poids du culot après centrifugation (dans des conditions données)
de la récolte débarrassée de CO₃Ca.

(Il est possible que la lyse accentuée observée en anaérobiose dépende, en partie, d'une neutralisation insuffisante des essais non agités mécanique-ment). Autrement dit, dans les 12 premières heures d'incubation, la croissance de la souche C a lieu à une vitesse plus grande en aérobiose qu'en anaérobiose, et, entre 12 et 18 heures d'incubation, à une vitesse plus grande en anaérobiose qu'en aérobiose; mais la masse totale de matière vivante synthétisée dans ces deux conditions différentes de croissance est finalement sensiblement la même quel que soit le degré d'aération des cultures.

(tableau 10)

Cette observation montrant que la souche C a des possibilités de synthèses égales, suivant qu'elle met en jeu ou non ses mécanismes respiratoires, nous paraît particulièrement intéressante.

B - PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE A PARTIR DES RESERVES HYDROCARBONEES DE LA SOUCHE C ISSUE DE CULTURES AEROBIES OU ANAEROBIES.

Les réserves hydrocarbonées intracellulaires des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ont déjà fait l'objet de nombreuses études par T.J.B. STIER et ses collaborateurs (66) (67). Ces auteurs ont constaté que la vitesse de mise en réserve du glycogène varie avec les conditions expérimentales, notamment avec le degré d'aération des cultures et la composition du milieu de culture et ils ont constaté en outre que les substrats endogènes ne sont pas attaqués par des processus de fermentation mais sont attaqués par la mise en oeuvre des mêmes mécanismes respiratoires intervenant dans l'attaque aérobie des hydrates de carbone introduits dans le milieu.

En ce qui concerne *B. coagulans* souche C, nous avons constaté que, dans des essais préparés suivant les indications données chapitre I paragraphe Ea et b, les masses bactériennes, en atmosphère de CO₂, sans addition de substrat hydrocarboné, donnent lieu à une formation d'acide lactique aux dépens de leurs réserves intracellulaires. *B. coagulans* se comporterait donc d'une façon différente de la levure qui, selon STIER dégraderait ses réserves hydrocarbonées en faisant intervenir uniquement un mécanisme respiratoire. Le dosage de l'acide lactique ainsi formé étant pris comme mesure des réserves hydrocarbonées des bacilles, on voit (tableau 11) que les bacilles provenant de cultures fortement aérobies ont des réserves hydrocarbonées 2 à 3 fois inférieures à celles des bacilles provenant

T A B L E A U 10

CROISSANCE EN SEMI-AEROBIOSE, EN AEROBIOSE ET EN ANAEROBIOSE

DE BACILLUS COAGULANS SOUCHE C

Précultures sur milieu S - Cultures sur milieu II

Température d'incubation = 50°

N° des expériences	Volume total	Agitation mécanique	Durée d'incubation en heures	Poids total de la récolte		Poids de la récolte	
	de milieu en litres	des cultures	tion en heures	frais en grammes	sec en grammes	frais en grammes par litre de milieu	sec en grammes par litre de milieu
I - Cultures semi-aérobies							
52 04 30	4	0	19	-	4,20	-	1,05
52 05 08	4	0	19	-	4,41	-	1,1
52 05 20	4	0	20	-	4,40	-	1,1
53 03 26	4	+	18	24,3	-	6	-
II - Cultures aérobies							
52 12 04	2	+	19.30'	-	2,16	-	1,08
52 03 18	4	+	18	-	4,08	-	1,02
53 02 16	1	+	12	2,95	-	2,95	-
	1	+	20	4,0	-	4,0	-
	1	+	45	3,9	-	3,9	-
53 06 12	2	+	19	10	1,75	-	0,88
53 06 24	2	+	19	10,3	1,55	-	0,78
III - Cultures anaérobies (°)							
53 02 16	4	+(°)	12	~0	-	~0	-
	"	+(°)	20	16	-	4	-
	"	+(°)	45	lyse forte	-	-	-
53 05 06	4	+	18	24,3	4,8	6,05	1,2
53 06 04	4	+	18.30'	21,3	5,0	5,3	1,3
53 06 18	4	+	19	24	5,2	6	1,5

(°) Agitation non mécanique et non continue : remarquer la moins bonne croissance en milieu moins bien agité c'est-à-dire moins bien neutralisé et moins homogène.

T A B L E A U 11

ACIDE LACTIQUE FORME A PARTIR DES RESERVES HYDROCARBONEES DE
B. COAGULANS, SOUCHE C, PROVENANT DE CULTURES ANAEROBIES, SEMI-AEROBIES
OU AEROBIES ET ETUDIEES A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES EN ATMOSPHERE
DE CO₂, A 50°, PENDANT UNE HEURE.

N° des expériences	Bacilles mg (poids sec) par essai	Conditions de culture	Ac. lactique total formé en mg	Ac. lactique formé en mg pour 100 mg (poids sec) de bacilles
53 05 06	343	anaérobiose	22,8	6,6
53 06 04	417	"	22,4	5,7
51 11 16	120	sémi-aérobiose	8,7	7,2
50 06 01	294	"	23,5	8,0
50 10 27 ^(°)	269 ^(°)	"	21,6 ^(°)	8,0 ^(°)
53 04 16	196	aérobiose	5,1	2,6

(°) Expérience faite en 3 H.30.

de cultures semi-aérobies ou anaérobies.

(tableau 11)

C - DEGRADATION DU GLUCOSE ET DE QUELQUES AUTRES SUBSTANCES HYDROCARBONÉES
PAR LA SOUCHE C, A L'ÉTAT DE MASSES NON PROLIFÉRANTES.

a) Essais en atmosphère de CO_2 : Comme le montrent les tableaux 12 et 13, des masses non proliférantes de *B. coagulans* souches C ou F 5, issues de cultures semi-aérobies, placées en atmosphère de CO_2 , dans des conditions indiquées chapitre I paragraphe Ea et b, transforment totalement le glucose et le mannose en acide lactique. Le lévulose, le maltose, le saccharose, le raffinose et le galactose donnent lieu aussi à une formation d'acide lactique; le xylose, l'arabinose, le lactose, le mannitol, la glycérine et l'acide pyruvique ne sont pas transformés en acide lactique.

(tableaux 12 et 13)

Si les masses bactériennes mises en jeu proviennent non plus de cultures semi-aérobies, mais de cultures aérobies ou anaérobies, la transformation du glucose en acide lactique, en atmosphère de CO_2 , est également totale, mais la vitesse de formation de l'acide lactique des bacilles provenant de cultures aérobies paraît plus lente que celle des bacilles provenant de cultures anaérobies ou semi-aérobies.

La conclusion à tirer de ces expériences est que, placée en atmosphère de CO_2 en présence de glucose, la souche C, à l'état de masses non proliférantes, quel que soit le type de culture (semi-aérobie, anaérobie ou aérobie) dont elle est issue, se comporte comme un organisme homolactique, c'est-à-dire comme un organisme dont l'unique produit de transformation anaérobie du glucose est l'acide lactique.

b) Essais en atmosphère (50 % O_2 + 50 % CO_2).

Les masses non proliférantes de souche C placées en atmosphère (50 % O_2 + 50 % CO_2) dans les mêmes conditions que précédemment donnent lieu à une transformation du glucose en acide lactique toujours très importante mais qui n'est plus totale^(°). Il est probable que le glucose disparu non transformé en acide lactique subit, en partie ou en totalité, une oxydation complète en CO_2 et H_2O . Comme le montre l'expérience rapportée (tableau 14) dans laquelle 45 % seulement du glucose attaqué sont transformés en acide lactique, il n'y a production ni d'autres acides non volatils

(°) SMITH à propos de *B. coagulans* dit qu'une "unusual quantity of acid is formed from carbohydrates, the non-volatile acid being d-lactic acid and the volatile apparently acetic and propionic acids" (64) mais il ne précise pas les conditions de ses essais.

T A B L E A U 12

FORMATION D'ACIDE LACTIQUE A PARTIR DU GLUCOSEOU DE DIFFERENTES AUTRES SUBSTANCES HYDROCARBONÉES PAR B. COAGULANS, SOUCHE C,A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFÉRANTES.

- B. coagulans, Souche C, provient dans tous les cas de cultures semi-aérobies.
- Essais en atmosphère de CO_2 - Température = 50° .
- Concentration en substrat = 100 mg par essai de 25 ml.

(a) N° des expériences	(b) Bacilles mg (poids sec) par essai	(c) Substrat	(d) Durée de l'essai en heures	(e) Acide lactique formé au temps t en mg	(f) mg acide lactique correspon- dant aux réserves hydrocar- bonées in- tracellu- laires (calculé)	(g) mg acide lactique formés aux dépens du substrat (e-f)
50 10 27	269	glucose	1	121	21	100
50 10 27	269	lévulose	3.30'	113	21	92
50 12 11	311	mannose	2	124	24	100
50 05 22	283	galactose	1	29	22	7
50 10 27	269	xylose	3.30'	20	21	0
50 10 04	284	arabinose	3	17	22	0
50 10 04	284	maltose	3	103	22	81
50 05 11	391	lactose	1	30	30	0
50 10 04	284	saccharose	3	41.5	22	19.5
50 12 11	311	raffinose	2	36	24	12
50 10 27	269	mannitol	3.30'	14	21	0
50 06 01	294	glycérine	1	18	23	0
50 02 14	241	acide pyruvique	1	12	18	0

T A B L E A U 13

CARACTERE HOMOLACTIQUE DES SOUCHES C ET F 5

ETUDIEES A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES EN ATMOSPHERE DE CO₂

- Bacilles provenant de cultures semi-aérobies
- Température des essais = 50°

	Souche C		Souche F 5
N° de l'expérience	50 10 27	50 12 18	51 01 15
Bacilles mg (poids sec) par essai	269	3790	3672
Volume total de l'essai en ml	20	300	300
Durée des essais en minutes	210	120	270
Glucose en mg {	au temps 0	100	1500
	(au temps t	-	0
Acide lactique (en mg) apparu au temps t	123	1652	1648
Glucose disparu (en mg) au temps t	-	1500	1500

Le surplus d'acide lactique par rapport à la quantité théorique (calculée d'après le glucose initial) correspond à la dégradation des réserves hydrocarbonées intracellulaires.

T A B L E A U 14

COMPARAISON ENTRE ACIDITE TOTALE ET ACIDITE LACTIQUE

PRODUITES AU COURS DE LA DEGRADATION DU GLUCOSE PAR B.COAGULANS, SOUCHE C,
A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES EN ATMOSPHERE (50% O₂ + 50% CO₂).

- Bacilles = 339 mg (poids sec) par essai, provenant de cultures semi-aérobies.
- Volume total des essais = 20 ml.
- Tampon bicarbonate (0,1 M) cf. Chapitre I paragraphe E b 2°.
- Durée des essais : 1 heure à 50°.
- L'acide lactique total dosé au temps t = 0.847 millimol. soit 4,25 millième de millimol. pour 0,1 ml.
- L'acidité totale est calculée à partir de dosages manométriques de CO₃NaH, sur 0.1 ml de prise d'essai, au temps zéro et au temps t :

mm 3 CO ₂ pour 0.1 ml de prise d'essai					
N° des expériences	mesurés manométriquement après acidification avec SO ₄ H ₂		correspondant à l'acidité totale formée au temps t (a - b)	correspondant à l'acide lactique dosé	correspondant à des acides autres que l'acide lactique
	au temps zéro (a)	au temps t (b)			
51 11 06	206	115	91	94,8	0

ni d'acétyl-méthyl-carbinol .

(tableau 14)

L'ensemble de ces observations est à rapprocher des faits exposés au chapitre II mettant en évidence que le développement du système respiratoire hématinique de *B. coagulans* est fonction du degré d'aération de ses cultures.

Influence inhibitrice du 2-octanol sur la formation d'acide lactique à partir du glucose.

La plupart de nos essais en atmosphère ($50\% O_2 + 50\% CO_2$) ont été réalisés dans des récipients reliés à des barboteurs, permettant le passage continu du mélange gazeux (cf. chapitre I paragraphe E b 2°) . Ce barbotage a l'avantage d'assurer un apport constant d'oxygène, mais il a l'inconvénient de provoquer la formation de mousses qui passent dans les barboteurs. Il a donc été nécessaire d'introduire dans nos essais un "anti-mousse". Nous avons tout d'abord essayé d'utiliser le 2-octanol, substance dont la présence perturbe le dosage du glucose par la méthode de SHAFER-HARTMANN mais non celui de l'acide lactique par la méthode de FRIEDEMANN, COTONIO & SHAFER (cf. chapitre I), et nous avons constaté que, dans certaines conditions, il provoque une importante inhibition des réactions fermentaires étudiées.

Parmi les expériences résumées dans tableau 21 certaines montrent :

1°) qu'en atmosphère CO_2 , en récipient clos, la transformation du glucose en acide lactique subit, en présence d'alcool octylique, une inhibition atteignant 100 % dans l'expérience du 51-11-16 : en effet l'acide lactique dosé au temps t (en présence de glucose et d'alcool octylique) est pratiquement égal à l'acide lactique dosé au temps t dans les essais sans glucose et sans alcool octylique où le substrat de formation de l'acide lactique ne peut être que les réserves hydrocarbonées intracellulaires;

2°) qu'en atmosphère ($50\% O_2 + 50\% CO_2$) avec passage de gaz continu il n'y a pratiquement pas d'inhibition de formation d'acide lactique. Cette absence d'inhibition est probablement à mettre sur le compte d'un entraînement du 2-octanol (peu ou pas soluble dans l'eau) par le courant gazeux plus ou moins chargé de vapeur d'eau.

Ces constatations jointes au fait que l'alcool octylique exerce un effet inhibiteur sur la désulfuration enzymatique de la L cystéine,

(cf. chapitre IV), nous ont conduit à rejeter (cf. chapitre I) l'emploi de l'alcool octylique comme "anti-mousse".

Influence d'un "anti-mousse" organosilicique le "Rhodorsil 424".

L'anti-mousse organosilicique utilisable en milieux aqueux "Rhodorsil antimousse 424" perturbe les dosages de glucose par la méthode de SHAFER-HARTMANN dans les milieux acidifiés, mais ne perturbe ni les dosages d'acide lactique ni ceux d'hydrogène sulfuré. Cette substance n'exerce aucune action inhibitrice sur la formation d'acide lactique à partir du glucose ou sur la formation d'hydrogène sulfuré à partir de la L cystéine, par B. coagulans souche C.

D - DEGRADATION DU GLUCOSE EN ACIDE LACTIQUE PAR LA SOUCHE C A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES EN PRESENCE DE L CYSTEINE :

La recherche du ferment désulphydrase (cf. chapitre IV) chez B. coagulans, souche C, nous a conduit à introduire fréquemment dans nos essais de la L cystéine. Il nous a paru intéressant d'examiner si la L cystéine exerçait une influence sur la formation d'acide lactique.

Des essais en présence de la L cystéine comme unique substrat montrent que l'acide lactique dosé correspond à l'acide lactique formé aux dépens des réserves hydrocarbonées intracellulaires.

Autrement dit la L cystéine n'est pas un substrat dont la transformation donne lieu à la formation d'acide lactique. Dans les essais contenant du glucose la présence de L cystéine ne paraît pas exercer d'influence sur la transformation du glucose en acide lactique.

C H A P I T R E I V

MISE EN EVIDENCE D'UNE CYSTEINE-DESULFHYDRASE CHEZ B. COAGULANS; CARACTERES DE CE SYSTEME FERMENTAIRE EN FONCTION NOTAMMENT DE LA PRESENCE D'OXYGENE DANS LES CULTURES ET LES ESSAIS

Un très grand nombre de bactéries forment de l'hydrogène sulfuré à partir de cystine ou de cystéine présente à l'état libre ou combiné (protéines) dans le milieu de culture. Depuis les travaux de TARR (69) et de FROMAGEOT et coll., (24) (25) (78) (32) (34) (70), on sait que cette désulfuration dépend d'une réaction enzymatique catalysée par le ferment cystéine-désulfhydrase. L'étude précise de l'activité désulfhydrase des bactéries n'a été faite que dans un nombre assez restreint de cas, (tableau 15).

(Tableau 15)

Aucune donnée n'a été publiée jusqu'ici en ce qui concerne la désulfuration de la cystine et de la cystéine par B. coagulans et les bactéries lactiques vraies. Dans ce chapitre nous exposons les expériences nous ayant permis de mettre en évidence la présence d'une cystéine-désulfhydrase chez plusieurs souches de B. coagulans (capables de se comporter en organismes homolactiques) et l'absence de ce ferment chez deux bactéries lactiques vraies (Tbm Delbrücki et Sbm casei); nous déterminons, en outre, les principaux caractères de la désulfhydrase de B. coagulans souche C permettant de la comparer aux autres désulfhydrases connues.

A - RECHERCHE DE L'ACTIVITE "CYSTEINE-DESULFHYDRASE" CHEZ DIFFERENTS ORGANISMES HOMOLACTIQUES : Tbm DELBRÜCKI, Sbm CASEI ET BACILLUS COAGULANS.

Comme le montrent les expériences résumées dans le tableau 16, Tbm Delbrücki et Sbm casei, microorganismes classés parmi les bactéries lactiques vraies, cultivés en semi-aérobiose sur milieu L sont incapables, à l'état de masses non proliférantes, de désulfurer la L cystéine.

(Tableau 16).

T A B L E A U 15

MICROORGANISMES AYANT FAIT L'OBJET D'UNE ETUDE
DE LEUR SYSTEME CYSTEINE-DESULFHYDRASE.

Escherichia coli	(69) (24) (32)
Proteus vulgaris	(69) (41)
Proteus Morganii	(41)
B. subtilis	(69) (34) (70)
A. faecalis	(69)
B. megatherium	(69)
Ps. aeruginosa	(69)
Sarcina lutea	(69)
C. sporogenes	(69)
Serratia marcescens	(69)
Propionibacterium pentosaceum	(25) (78)
Levures de bière et de boulangerie	(9)

-O-O-O-O-O-O-O-

T A B L E A U 16

DESULFURATION DE LA L CYSTEINE PAR DIFFERENTES SOUCHES
DE MICROORGANISMES HOMOLACTIQUES VRAIS OU FACULTATIFS, PROVENANT DE
CULTURES SEMI-AEROBIES, ETUDIES A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES

EN ATMOSPHERE DE CO_2 - (récipients clos)

Concentration en L cysteine : $6.35.10^{-3}\text{M}$ (soit 20 mg. par essai)

Concentration en glucose : $2.78.10^{-2}\text{M}$.

N° des expé- riences	Souches	Bactéries mg poids sec par essai	Tempé- rature des essais	Durée en minutes	Q_{SH_2}	
					sans glucose	+ glucose
50 02 01	B.coagulans souche C A.T.C.C. 11.369 (non lyophilisé)	233	50°	60'	0.91	1.45
50 02 09	"	146	"	"	-	1.37
50 03 16	"	280	"	"	-	1.20
50 03 29	"	306	"	"	-	2.02
50 04 20	"	197	"	"	-	2.1
50 05 11	"	391	"	"	-	1.03
50 05 22	"	283	"	"	0.69	1.05
50 06 01	"	294	"	"	0.68	1.41
50 06 21	"	276	"	"	-	1.4
50 11 21	id. (lyophilisé)	382	"	"	0.73	0.89
49 12 21	B.coagulans souche F 5	225	50°	120'	-	1.26
50 10 17	"	450	37°	60'	0.34	0.49
52 11 13	B. coagulans A.T.C.C. 10.545	260	50°	60'	-	2.48
50 10 20	Tbm Delbrücki	217	45°	60'	0	0
50 10 30	"	174	"	120'	0	0
50 05 05	Sbm casei	205	37°	60'	0	0
50 05 09	"	289	"	210'	0	0

Au contraire, les trois souches suivantes de *B. coagulans* : souche C (A.T.C.C. 11.369), souche F 5 et souche A.T.C.C. 10.545, désulfurent la L cystéine à une vitesse qui, exprimée en Q_{SH_2} ($\mu g.$ de SH_2 libérés par mg de bacilles (poids sec) et par heure), est de l'ordre de 1 à 2 si les essais contiennent du glucose. Si les essais ne contiennent pas de glucose, ces vitesses sont plus faibles; dans le cas de la souche C, l'écart peut atteindre 50% (tableau 16).

Comme dans les essais témoins, ne contenant pas de bacilles, la quantité de SH_2 libérée du fait de la décomposition spontanée de la L cystéine est pratiquement négligeable (0 à 20 μg), et comme dans d'autres essais témoins contenant, non plus des bacilles vivants, mais des bacilles portés pendant 10 minutes à une température de 100°, les quantités de SH_2 libérées sont, là aussi, négligeables (tableau 20), on est en droit de conclure que les quantités relativement importantes d'hydrogène sulfuré libérées en présence de bacilles vivants dépendent d'une réaction de désulfuration enzymatique et que les 3 souches considérées de *B. coagulans* contiennent une cystéine-désulfhydrase.

La valeur de Q_{SH_2} moyenne trouvée dans le cas de la souche C, en présence de glucose, est 1.4 c'est-à-dire tout à fait la même que celle mesurée par P. DESNUELLE, E. WOOKEY, Cl. FROMAGEOT (25) chez *Prop. pentosaceum* ($Q_{SH_2} = 1.5$), mais elle est 10 fois plus faible que celle mesurée par Cl. FROMAGEOT & TCHEN PAU KIUN (34) chez *B. subtilis*.

B - CARACTERES DE LA DESULFHYDRASE DE B. COAGULANS PROVENANT DE CULTURES SEMI-AEROBIES :

a) Désulfuration de la L cystéine en atmosphère CO_2 (récipients clos).

1°) Allure de la réaction en fonction du temps :

Les résultats des expériences donnés dans le tableau 17 montrent tout d'abord que la réaction de désulfuration de la L cystéine par *B. coagulans* souche C, en présence de glucose, débute sans période d'induction à une vitesse qui ne fait que se ralentir en fonction du temps.

(tableau 17)

Cette première constatation élimine l'hypothèse suivant laquelle la désulfhydrase de *B. coagulans* serait comme celle de *E. coli* un ferment d'adaptation et permet de conclure, au contraire, qu'elle est, comme celle de *Propionibacterium* et de *B. subtilis*, un ferment de constitution.

T A B L E A U 17

VITESSE DE DESULFURATION DE LA L CYSTEINE

EN FONCTION DU TEMPS, EN PRESENCE DE GLUCOSE.

- Bacilles, à l'état de masses non proliférantes, issus de cultures semi-aérobies.
- Glucose $2.78.10^{-2}$ M.
- Atmosphère CO_2 soit en récipient clos, soit avec passage continu de CO_2 et extraction de SH_2 .

N° des expériences	mg poids sec bacilles par essai	Ex-trac-tion SH_2	L cystéine par essai de 20 ml	Durée des essais en heures	μg SH_2 libérés	Q_{SH_2}
52 05 13	336	-	2,5	0.5	50	0.30
				1	110	0.32
				2	140	0.20
				3	160	0.15
52 05 20	367	-	20	0.5	237.5	1.30
				1	424.5	1.15
				3	675	0.61
				4	554	0.60
52 05 27	268	+	20	0.5	470	3.5
				1	714	2.66
				3	940	1.17

La deuxième constatation ressortant de ces expériences est que les masses bactériennes mises en jeu n'ont pas le pouvoir, même dans des expériences de longue durée, de désulfurer la totalité de la L cystéine présente. Dans l'expérience (52 05 13) on voit, d'une façon particulièrement nette, que la réaction s'arrête après libération d'environ 30 % du SH_2 libérable. L'existence d'une limite à la réaction ne dépend pas uniquement de la fatigue des cellules bactériennes, elle traduit un équilibre de réaction que l'on est en mesure de déplacer en éliminant le SH_2 au fur et à mesure de sa formation, comme cela a été réalisé dans l'expérience (52 05 27).

2°) Influence de la concentration en bacilles.

Le tableau 18 montre qu'en présence d'un excès de substrat (20 mg L cystéine par essai de 20 ml, soit $4.320 \mu\text{g SH}_2$ libérables) des masses bactériennes comprises entre 45 et 367 mg (poids sec) ont une vitesse de désulfuration (Q_{SH_2}) sensiblement constante, autrement dit, que la quantité de SH_2 libéré initialement (dans les 30 premières minutes) est sensiblement proportionnelle à la quantité de bacilles mise en jeu).

(tableau 18)

3°) Influence de la concentration en L cystéine.

Pour une masse de bacilles constante, la vitesse initiale de désulfuration (Q_{SH_2} correspondant à la première heure) croît en fonction de la concentration en substrat (tableau 19) suivant une courbe (représentée figure 3) dont la forme se rapproche de celle d'une hyperbole rectangulaire.

(tableau 19)

4°) Substances activatrices et inhibitrices de la réaction.

Comme cela a déjà été dit, le glucose ($2.78.10^{-2}\text{M}$) augmente la vitesse de désulfuration de la L cystéine (cf. tableau 16 et 20) de 50 % à 100 %. Un effet accélérateur du même ordre est obtenu en substituant, au glucose, de la glycérine. Le galactose et le lactose sont sans action accélératrice.

(tableau 20)

Au contraire l'acide pyruvique est inhibiteur de la réaction. Cette réaction inhibitrice a déjà été observée dans le cas de la désulphydase de *Propionibacterium pentosaceum* (25) et de la désulphydase hépatique (33). Elle traduit, comme la chose a été démontrée dans le cas de la désulphydase hépatique, la présence d'un groupement CO actif dans la constitution du ferment.

(tableau 21)

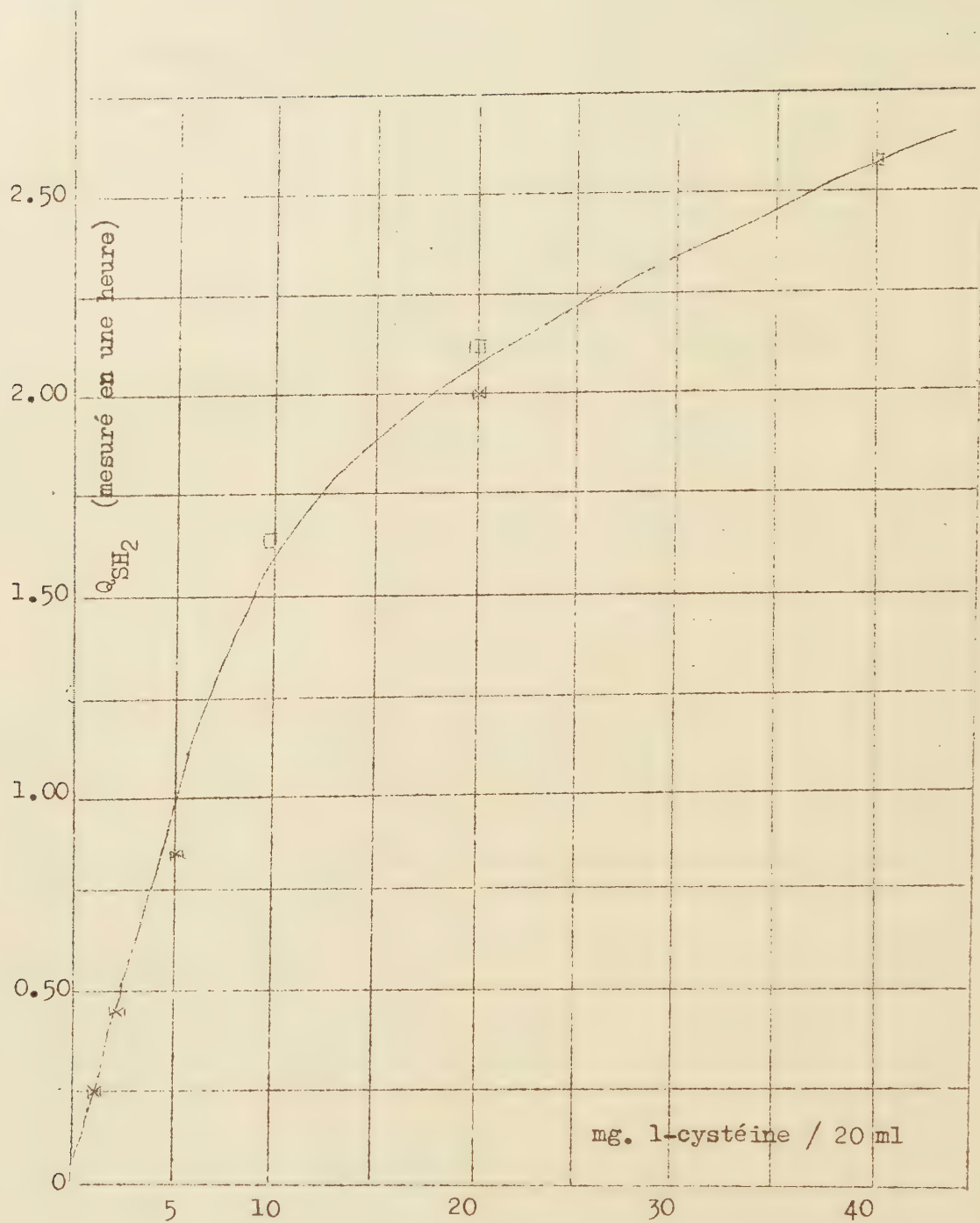
T A B L E A U 18

VITESSES DE DESULFURATION DE LA L CYSTEINE EN PRESENCE DE GLUCOSE
EN FONCTION DE LA MASSE DE B.COAGULANS, SOUCHE C,MISE EN JEU.

- Les masses non proliférantes de B. coagulans souche C proviennent de cultures semi-aérobies.
- Essais en atmosphère de CO₂ - récipients clos.
- Concentration en glucose = $2.78.10^{-2}M$
- Concentration en L cystéine = $6.35.10^{-3}M$ (20 mg/20 ml)
- Durée des essais = 30 minutes à 50°.

N° des expériences	Bacilles mg (poids sec) par essai	µg SH ₂ libérés	Q _{SH₂}
50 01 15	45.7	13	0.57
	91.4	70	1.53
	137.1	114	1.66
	182.8	207	2.26
52 05 20	367	240	1.3

FIGURE 3



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION

EN L CYSTEINE SUR LA VITESSE DE DESULFURATION.

T A B L E A U 19

VITESSES DE DESULFURATION. PAR B. COAGULANS, SOUCHE C,
A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFÉRANTES, EN PRESENCE DE GLUCOSE,
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN L CYSTEINE.

- B. coagulans provient de cultures semi-aérobies.
- Essais en atmosphère de CO₂.
- Concentration en glucose = $2.78.10^{-2}$ M.
- Durée des essais : 1 heure à 50°.

N° des expériences	Bacilles mg (poids sec) par essai	L cystéine		SH ₂ libéré en µg	% SH ₂ libéré	Q _{SH₂}
		mg par essai	SH ₂ max. libérable par essai			
50 03 29	306	1	216	82	38	0.268
"	"	2	432	125	29	0.41
"	"	5	1080	257	23	0.84
50 04 20	197.5	10	2160	330	15	1.67
50 03 29	306	20	4320	618	14	2.02
50 04 20	197.5	20	4320	418	10	2.12
"	197.5	40	8.640	514	6	2.6

T A B L E A U 20

INFLUENCE DE DIFFERENTES MOLECULES HYDROCARBONEES,
AUTRES QUE LE GLUCOSE SUR LA DESULFURATION DE LA L-CYSTEINE
PAR B. COAGULANS (SOUCHE C) A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES
PROVENANT DE CULTURES SEMI-AEROBIES

- Concentration de la L-cystéine : 6.35×10^{-3} M.
- Concentration des différentes substances ajoutées : 2.78×10^{-2} M.
- Durée de l'expérience : 1 heure; atmosphère des essais = CO₂ pur
- Température = 50°.

N° des expériences	Substances ajoutées	mg bacilles (poids sec) par essai	Q _{SH₂}
50 02 14	Glucose	241	0.75 ^(°)
"	Acide pyruvique	241	0
50 06 01	O	294	0.68
"	Glucose	294	1.4
"	Glycérine	294	1.2
50 05 11	Glucose	391	1.06
"	Lactose	391	0.93
50 05 22	O	283	0.69
"	Glucose	283	1.05
"	Glucose	(bactéries bouillies)	0
"	Lactose	283	0.65
"	Galactose	283	0.74

(°) Récolte bactérienne conservée à la glacière, avant usage, pendant 4 heures.

T A B L E A U 21

INFLUENCE DU 2-OCTANOL SUR LA FORMATION D'ACIDE LACTIQUE

A PARTIR DU GLUCOSE ET SUR LA FORMATION DE SH₂ A PARTIR DE LA L CYSTEINE
PAR B. COAGULANS SOUCHE C A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES ISSUES DE

CULTURES SEMI-AEROBIES.

- L cystéine : $6.35 \times 10^{-3} M$
- Glucose : $2.78 \times 10^{-3} M$
- 2-octanol environ 0,75 %.
- Durée des essais : 1 heure à 50°.

N° des expé- riences	Bacilles mg (poids sec) par essai	G l u c e	L c y s t é i n e	Atmosphère des essais	SH ₂		mg acide lactique dosés au temps t	
					Essais sans 2-octa- nol	+ 2-octa- nol	Essais sans 2-octa- nol	+ 2-octa- nol
51 11 13	262	+	+	CO ₂	-	<u>0.21</u>	-	17
"	"	+	+	{ 50% O ₂ + (50% CO ₂	-	{ 1.85	-	{ 92
"	"	+	0	"	-	-	-	93
51 11 16	120	+	+	CO ₂	2.3	~ <u>0.0</u>	-	-
"	"	+	0	"	-	-	76.25	8.3
"	"	0	0	"	-	-	8.73 ^{(°)(°)}	-
52 01 29	531 ^(°)	+	+	CO ₂	1.2	<u>0.1</u>	-	-
"	"	+	+	{ 50% O ₂ + (50% CO ₂	-	1.8	-	-

(°) Culture en aérobiose

(°)(°) Acide lactique formé à partir des réserves hydrocarbonées des bacilles.

Le 2-octanol, inhibiteur de la formation d'acide lactique à partir du glucose, provoque aussi une inhibition totale de la désulfuration réalisée en atmosphère de CO_2 et en récipient clos. (tableau 21).

Le "Rhodorsil 424" utilisé comme anti-mousse dans nos essais est, par contre, sans effet inhibiteur sur la désulfuration. (tableau 22)

(tableau 22)

b) Désulfuration de la cystine, en atmosphère CO_2 (récipients clos)
existence chez B. coagulans d'une cystine-réductase.

Si dans les essais ne contenant pas de glucose, la L ou la DL cystine sont substituées à la cystéine, on constate (tableau 23) que la désulfuration n'a pas lieu, même si la durée des essais est prolongée durant plusieurs heures. Si les essais contiennent du glucose, la vitesse de désulfuration reste, là encore, nulle ou faible durant la première heure de la réaction mais, ultérieurement, la désulfuration atteint une valeur du même ordre qu'en présence de cystéine (cf. expérience 50 07 06).

(tableau 23)

On retrouve donc avec B. coagulans les phénomènes précédemment observés dans le cas de Prop. pentosaceum. La présence nécessaire d'un donateur d'hydrogène tel que le glucose et l'existence d'une période d'induction avant que la désulfuration de la cystine ne se manifeste, témoignent du fait que la cystine avant de subir l'action de la désulfhydrase a besoin d'être réduite en cystéine par une cystine-réductase.

B. subtilis, dépourvu de cystine-réductase est incapable, même en présence de glucose, de désulfurer la cystine (70).

L'expérience (50 07 06) du tableau 23 montre, en outre, que L et DL cystine sont également bien désulfurées par B. coagulans; il n'y a pas lieu de supposer une spécificité optique de la réaction.

L'absence de période d'induction dans l'attaque de la cystéine nous a conduit à supposer que la désulfhydrase de B. coagulans est un ferment de constitution. Nous avons confirmé cette conclusion en cultivant la souche C sur un milieu contenant de la cystine (beaucoup plus stable que la cystéine) et en mesurant l'activité désulfurante des bacilles récoltés sur un tel milieu (tableau 24). On voit que les vitesses de désulfuration de la L cystéine sont sensiblement les mêmes que celles obtenues en utilisant des bacilles cultivés en absence de cystine.

(tableau 24)

T A B L E A U 22

INFLUENCE DU "RHODORSIL 424"SUR LA FORMATION DE L'ACIDE LACTIQUE A PARTIR DU GLUCOSE
ET SUR LA FORMATION DE L'HYDROGENE SULFURE A PARTIR DE LA L CYSTEINEPAR B. COAGULANS, SOUCHE C.- Concentration L cystéine = $6.35 \cdot 10^{-3}$ M.- Concentration glucose = $2.78 \cdot 10^{-3}$ M.

- Durée des essais = 1 heure à 50°.

F = essais dans des récipients fermés.

E = " avec barbotage gazeux et extraction continue de SH_2 .

N° des expé- riences	Bacilles mg (poids sec) par essai	Glucose	L cystéine	Récipients	Q _{SH₂}		mg acide lactique au temps t	
					Essais		Essais	
					sans rhodor- sil	+ rhodor- sil	sans rhodor- sil	+ rhodor- sil
I - Essais en atmosphère de CO ₂								
52 02 04	468	+	+	F	1,60	1,44	-	-
	"	"	"	"	1,48	1,42	-	-
52 03 28	537	+	+	F	-	1,23	-	105
	"	+	+	E	-	2,62	-	98
II - Essais en atmosphère (50 % O ₂ + 50 % CO ₂)								
52 12 17	213	+	+	E	-	5,4	-	97
	"	0	+	E	-	1,9	-	18
53 05 06	343	0	0	E	-	-	19	-
	"	+	0	E	-	-	102	-

T A B L E A U 23

COMPARAISON ENTRE L'APTITUDE DESULFURANTE

DE B. COAGULANS, SOUCHE C, (EN PRESENCE OU NON DE GLUCOSE)

VIS A VIS DE LA L CYSTEINE D'UNE PART ET DE LA L ET DL CYSTINE D'AUTRE PART.

- Les masses non proliférantes de souche C proviennent de cultures semi-aérobies sauf dans l'expérience du 50 03 22^(o) où elles proviennent de cultures en anaérobiose.
- Essais en atmosphère de CO₂.
- Concentration en glucose : $2.78.10^{-2}$ M.
- Concentration en L cystéine : $1.59.10^{-3}$ M (5mg/20ml)
- Concentration en L et DL cystine : $0.78.10^{-3}$ M (3.8 mg/20 ml)

N° des expé- riences	Bacilles (poids mg sec) par essai	Durée en heures	Glucose	Cystine			L cystéine	
				L ou DL µg SH ₂ libé- rables	L	DL	µg SH ₂ libé- rables	µg SH ₂ libérés
					µg SH ₂ libérés			
50 02 09	146	1	0	5650	0	-	4320	-
"	"	"	+	"	4	-	"	200
50 03 22 ^(°)	280 ^(°)	1	+	4800	46	-	4320	-
"	"	8	0	"	44	-	"	-
"	"	"	+	"	450	-	"	792
50 07 06	242	3	+	1080	349	212	1080	-
"	"	5	+	"	289	248	"	314

T A B L E A U 24

VITESSE DE DESULFURATION DE LA L CYSTEINE
PAR B. COAGULANS, SOUCHE C.A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES
PROVENANT DE CULTURES EN SEMI-AEROBIOSE SUR MILIEU CONTENANT DE
LA L CYSTINE (CONCENTRATION $3.33.10^{-3}$ M).

- Concentration en L cystéine : $6.35.10^{-3}$ M
- Tous les essais sont additionnés de glucose $2.78.10^{-2}$ M et de "rhodorsil" 1.10^{-5} .
- Durée des essais = 1 heure à 50°.

N° des expériences	mg (poids sec) de bacilles par essai	Q _{SH₂} mesuré en atmosphère CO ₂		Q _{SH₂} mesuré en atmosphère (50% CO ₂ + 50% O ₂)
		récipient clos	extraction continue de SH ₂	extraction continue de SH ₂
52 07 01	106	2.6	-	5.4
52 09 18	310	1.65	4.55	3.42
"	"	0.13 ^(°) (25 à 54 µg)	-	-

(°) essai témoin ne contenant pas de L cystéine, pour mesurer les quantités de cystine insoluble éventuellement entraînées au cours de la récolte des bactéries.

c) Désulfuration de molécules soufrées autres que cystéine et cystine; spécificité chimique de la désulphydrase.

B. coagulans, souche C, ne désulfure ni l'acide thioglycolique, ni l'acide thiobutyrique, ni l'acide thiomalique, ni la méthionine, ni le glutathion réduit. La spécificité chimique du système de désulfuration de B. coagulans est étroite.

C - ACTIVITE DESULFURANTE DE B. COAGULANS PROVENANT DE CULTURES AEROBIES OU ANAEROBIES.

a) Désulfuration de la L cystéine étudiée en atmosphère CO_2 :

1°) en récipients clos : la vitesse moyenne de désulfuration de la L cystéine, par B. coagulans, souche C, en atmosphère de CO_2 et en récipient clos ne varie pas très sensiblement, que les masses de bacilles utilisées proviennent de cultures anaérobies, semi-aérobies ou aérobies (tableaux 16 et 25)

(tableau 25)

Il convient de signaler, à ce propos, les expériences de R.E. KALLIO & J.R. PORTER (41) d'après lesquelles les masses non proliférantes de Proteus vulgaris et Proteus Morganii, provenant de cultures contenant de la cystine ou de la cystéine, ont une activité désulfurante plus grande si ces cultures ont été faites en anaérobiose que si ces cultures ont été faites en aérobiose.

2°) avec barbotage de CO_2 et extraction continue de SH_2 :

Quand nos essais sur B. coagulans sont réalisés non plus dans des récipients clos, mais dans des récipients traversés par un courant continu de CO_2 entraînant, au fur et à mesure de sa formation, l'hydrogène sulfuré dans des barboteurs contenant de l'acétate de zinc (cf. chapitre I, paragraphe E b 2°), on constate que cette extraction continue de SH_2 déséquilibre la réaction et provoque un accroissement net de la vitesse de désulfuration; cf. tableau 26 essais sans glucose (expérience 53 06 12) :

$Q_{\text{SH}_2} = 1,66$ (récipient clos) $Q_{\text{SH}_2} = 1,70$ (avec extraction); essais avec glucose $Q_{\text{SH}_2} = 1,15$ (expérience 52 05 20 récipients clos) et $Q_{\text{SH}_2} = 3,0$ (expérience 52 05 27 avec extraction).

TABLEAU 25

VITESSES DE DESULFURATION DE LA L CYSTEINE

PAR B. COAGULANS, SOUCHE C, A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES,
ISSUES DE CULTURES AEROBIES OU ANAEROBIES ET ETUDIEES, AU COURS D'ESSAIS
EN ATMOSPHERE DE CO₂, DANS DES RECIPIENTS CLOS.

- Concentration en L cystéine : $6.35.10^{-3}$ M.
- " en glucose : $2.78.10^{-2}$ M.
- Durée = 1 heure à 50°.

N° des expériences	B. coagulans N° de la souche	mg bacilles (poids sec) par essai	Q _{SH₂}	
			essais sans glucose	essais + glucose
I - <u>Bacilles provenant de cultures aérobies.</u>				
51 10 17	A.T.C.C. 11.369	404	-	1.43
52 01 29	"	531	-	1.22
52 06 05	"	204	-	2.40
52 12 04	"	228	1.34	1.60
53 01 07	"	99	1.82	1.82
53 06 12 ^(°)	"	168	1.66 ^(°)	-
52 11 20	A.T.C.C. 10.545	230	-	1.58
52 11 26	"	213	2.5	2.50
II - <u>Bacilles provenant de cultures anaérobies.</u>				
53 02 16	A.T.C.C. 11.369	386	-	1.62
53 06 18	"	434	1.44	1.40

(N.B. - Aucune influence de l'âge de la préculture).

(°) cf. tableau 26 même essai avec extraction continue de SH₂.

b) Désulfuration de la L cystéine étudiée en atmosphère (50% O₂ + 50% CO₂).

Pour assurer un apport constant d'oxygène et surtout pour éviter une oxydation du SH₂ libéré qui fausserait les mesures de désulfuration, il est nécessaire que les essais en atmosphère contenant de l'oxygène comportent à la fois un barbotage gazeux constant et une continuelle extraction de SH₂.

Pour apprécier correctement l'influence de l'oxygène sur la réaction de désulfuration, il sera donc nécessaire de ne comparer les mesures faites en atmosphère (50% O₂ + 50% CO₂) qu'à celles effectuées en atmosphère de CO₂ avec un barbotage gazeux et extraction continue de SH₂ (tableau 26).

(Tableau 26)

Les résultats expérimentaux résumés dans les tableaux 26 et 27 permettent d'établir une telle comparaison.

(Tableau 27)

Il apparaît alors les faits suivants :

- Si les essais contiennent du glucose, que les bacilles utilisés proviennent de cultures anaérobies, semi-aérobies ou aérobies, la vitesse de désulfuration en atmosphère (50% CO₂ + 50% O₂) est, dans tous les cas, très nettement plus élevée qu'en atmosphère CO₂.
- Si les essais ne contiennent pas de glucose, l'action activatrice de l'oxygène sur la désulfuration est nulle, dans le cas des bacilles issus de cultures anaérobies, et très marquée, au contraire, dans le cas de bacilles issus de cultures aérobies.

D - APPORTS EXOGENES DE PYRIDOXINE ET ACTIVITE CYSTEINE-DESULFHYDRASE DE B. COAGULANS, SOUCHE C.

Un certain nombre de travaux - BINKLEY & Coll. (9) (10);

KALLIO (42); BRAUNSTEIN & AZARKH (12); BRAUNSTEIN & GORYACHENKOVA (13); AZARKH & GLADKOVA (3) - tendent à prouver que le groupement prosthétique de l'enzyme cystéine-désulfhydrase serait le phosphopyridoxal. AZARKH & GLADKOVA ont montré que Streptococcus faecalis n'était capable de désulfurer la L-cystéine que s'il s'était développé sur un milieu lui apportant une quantité convenable de pyridoxine et que les préparations sèches de ce même microorganisme, cultivé sur milieu carencé en B₆, contenaient

T A B L E A U 26

VITESSES DE DESULFURATION DE LA L CYSTEINE

PAR B. COAGULANS, SOUCHE C, A L'ETAT DE MASSES NON PROLIFERANTES,
MESUREES EN ATMOSPHERE (50% O₂ + 50 % CO₂) OU EN ATMOSPHERE DE CO₂

DANS DES ESSAIS COMPORTANT L'EXTRACTION CONTINUE
DE L'HYDROGENE SULFURE LIBERE. (cf. Chap. I paragraphe E 2°).

- Concentration en L cystéine = $6.35.10^{-3}$ M.
- Concentration en glucose = $2.78.10^{-2}$ M.
- Durée = 1 heure à 50°.

N° des expé- riences	Conditions de culture de B.coagulans	Bacilles mg (poids sec) par essai	Q _{SH₂}			
			mesuré en atmosphère (50% CO ₂ + 50% O ₂)		mesuré en atmosphère CO ₂	
			sans glucose	+ glucose	sans glucose	+ glucose
52 03 18	aérobiose	408	-	3.6	-	-
52 04 01	"	631	-	3.44	-	1.94
53 04 16	"	196	3.5	3.3	- ^(°)	-
53 06 12	"	168	-	-	1.7 ^(°)	-
52 02 07	semi- aérobiose	507	-	3.2	-	-
52 03 28	"	537	-	-	-	2.62
52 05 27 ^{(°)(°)}	"	268 ^{(°)(°)}	-	-	-	3.00 ^(°)
52 12 17	"	213	1.92	5.35	-	-
53 05 06	ana- érobiose	343	1.6	4.2	-	3.1 ^(°)
53 06 18	"	434	-	-	1.69	1.76 ^(°)

(°) cf. tableau 25, exp. 53 06 12 en récipients clos (Q_{SH₂} = 1.66)

'(°)(°) cf. tableau 17, exp. 52 05 20 en récipients clos (Q_{SH₂} = 1.15)

N.B. - Il n'est pas exclu que l'accroissement des valeurs de Q_{SH₂} en atmosphère de CO₂, quand les essais comportent une extraction continue de CO₂, dépende non seulement du déséquilibre de la réaction, du fait de l'extraction de SH₂, mais aussi de la présence de traces d'oxygène dans le gaz carbonique.

T A B L E A U 27

VALEURS MOYENNES DES VITESSES DE DESULFURATION
DE LA L-CYSTEINE, PAR B. COAGULANS, SOUCHE C, EN ATMOSPHERE DE CO₂
ET EN ATMOSPHERE (50% CO₂ + 50% O₂).

- Bacilles à l'état de masses non proliférantes provenant de cultures anaérobies, semi-aérobies ou aérobies.
- Concentration en L cystéine : 20 mg par essai de 20 ml.
- Concentration en glucose : $2.78.10^{-2}$ M.
- Concentration en "Rhodorsil 424" : 1.10^{-5} .

Bacilles provenant de cultures	Q _{SH₂}					
	Essais en atmosphère CO ₂				Essais en atmosphère (50% O ₂ + 50% CO ₂)	
	clos		avec extraction		avec extraction	
	sans glucose	+ glucose	sans glucose	+ glucose	sans glucose	+ glucose
anaérobies	1.44	1.51	1.70	2.4	1.6	4.2
semi- aérobies	0.76	1.45	-	2.8	1.9	4.3
aérobies	1.6	1.7	1.7	1.9	3.5	3.5

l'apoenzyme de désulfuration et retrouvaient leur aptitude à désulfurer la L cystéine après addition de phosphopyridoxal.

(Tableau 28)

Dans le but de savoir si un apport exogène de pyridoxine était susceptible d'accroître l'activité désulfurante de B. coagulans souche C, nous avons réalisé les expériences résumées dans le tableau 28. Les résultats obtenus montrent que des bacilles, soumis à un épuisement de leur réserve par une incubation de 1 H.30 à 3 H., ont une aptitude désulfurante qui n'est pas accrue par addition de pyridoxine. Ceci, en accord avec le fait que B. coagulans est sans exigence en pyridoxine, (cf. chapitre II), semble indiquer que B. coagulans est capable d'effectuer de toutes pièces la synthèse du phosphopyridoxal, coenzyme de désulfuration.

T A B L E A U 28

ACTIVITE DESULFURANTE DE B. COAGULANS, SOUCHE C,
ET APPORTS EXOGENES DE PYRIDOXINE.

Les expériences sont faites à l'aide de masses non proliférantes de la souche C provenant de cultures semi-aérobies, récoltées aseptiquement et divisées en deux fractions A et B.

La fraction A est agitée pendant un certain temps au bain-marie à 50°, en solution tampon phosphate (0.25 M), pH = 6,4, glucosée (0.278 M);

la fraction B est maintenue le même temps dans le même milieu additionné de pyridoxine.

Après une telle incubation les bacilles des fractions A et B sont récoltés séparément par centrifugation et leurs vitesses de désulfuration de la L cystéine sont mesurées dans des essais maintenus 1 H. à 50°, en atmosphère N₂(R), en solution tampon phosphate (0.17 M; pH = 6.4).

	Expérience 51 12 11		Expérience 52 01 08	
	Fraction A	Fraction B	Fraction A	Fraction B
I - <u>Conditions d'incubation</u> : volume liquide total = 200 ml.				
bacilles, mg				
(poids sec)	787	810	830	830
durée en heures	1 h. 30	1 h. 30	3 h.	3 h.
pyridoxine ajoutée				
en µg	0	200	0	3000
II - <u>Désulfuration de la L cystéine</u> (6.35 x 10 ⁻³ M). Volume liquide de chaque essai = 22 ml.				
bacilles, mg				
(poids sec) par essai	324	310	353	339
SH ₂ µg. dosés dans				
chaque essai	(150 (170	(216 (201	(427 (427	(466 (468
Q _{SH₂}	0.5	0.67	1.2	1.38
% d'augmentation de				
la désulfuration de				
la fraction traitée	-	+ 13 %	-	11.5 %
par la pyridoxine par				
rapport à la fraction				
non traitée				

CHAPITRE V

FERMENTS HEMATINIQUES DE B. COAGULANS CULTIVE

EN AEROBIOSE OU EN ANAEROBIOSE.

Une étude des ferments hématiniques de *B. coagulans* nous a paru importante à un double point de vue.

- D'une part, il est intéressant de savoir si un organisme, capable de libérer de l'hydrogène sulfuré, est pourvu ou non d'un système respiratoire hématinique classique : Système Warburg-Keilin comportant les cytochromes a, b et c et le ferment respiratoire (autoxydable, inhibable par CO, HCN, H₂S) et, dans quelle mesure, il y a interférence entre phénomènes de respiration et de désulfuration;
- et d'autre part, il est également intéressant de savoir si *B. coagulans*, organisme pouvant se comporter en homolactique, s'apparente, en ce qui concerne son système respiratoire, soit aux organismes homolactiques, type bactéries lactiques vraies, dépourvus de cytochromes et de catalase, dont la respiration est insensible à HCN, soit aux organismes homolactiques étudiés par DAVIS en 1933 (23) et par O. WARBURG en 1946 (73) dont la respiration et la fermentation sont sensibles à HCN.

Nous exposons, dans ce chapitre, l'ensemble des observations et expériences qui nous ont révélé que la teneur en cytochrome et en catalase de *B. coagulans*, était étroitement liée au degré d'aération de ses cultures.

A - CYTOCHROMES.

Il n'existe, à notre connaissance, aucune donnée bibliographique en ce qui concerne la présence des cytochromes chez *B. coagulans*.

1°) Cultures fortement aérobies.

Le tableau 29 donne la position des bandes d'absorption, repérée à l'aide du spectroscope de poche ZEISS ou du spectroscope de HARTRIDGE, en examinant les pâtes microbiennes, maintenues à l'état réduit, soit à la température ordinaire, soit à la température de l'azote liquide, suivant les indications données chapitre I G.

Ces bandes d'absorption correspondent à des pigments respiratoires cytochromiques, comme le montrent les essais suivants : une suspension de *B. coagulans* provenant de cultures fortement aérobies, contenant environ 40% (poids frais) de bacilles et examinée à l'aide du spectroscope de ZEISS sous une épaisseur de 1 cm. en atmosphère d'azote "R", présente un spectre qui disparaît quand la suspension bactérienne est agitée en présence d'air. Suivant que la préparation est placée en atmosphère inerte ou fortement aérée, le spectre apparaît ou disparaît. La préparation fortement aérée, additionnée de CNK à une concentration d'environ 10^{-3} M présente, à nouveau, un spectre typique de cytochromes réduits.

Il ressort de ces données que la souche C (*B. coagulans* 11.369) cultivée en aérobiose, présente à l'état réduit un spectre visible correspondant à deux pigments hématiniques : l'un, type cytochrome b₁, dont la bande est située à 559 mμ; l'autre, type cytochrome a, dont la bande se trouve à 603 mμ. Le refroidissement dans l'azote liquide à - 192° ne modifie pas sensiblement la position de ces bandes. Le fait que ces deux pigments correspondent aux cytochromes a et b₁ est confirmé par l'apparition, après traitement par la pyridine, de deux bandes respectivement centrées sur 588 mμ (bande de l'hémochrome de pyridine du cytochrome a) et 557 mμ (bande de l'hémochrome de pyridine du protohème). Le refroidissement à - 192° ne modifie ni le nombre, ni la position de ces bandes.

Des observations, faites sur *B. coagulans* 10.545, conduisent aux mêmes conclusions.

(Tableau 29)

Le tableau 29 montre, en outre, que, contrairement à ce que l'on observe chez la levure et *B. subtilis* (19), le spectre des cultures en aérobiose de *B. coagulans* n'évolue pas en fonction du temps : le cytochrome b₁, apparu après 12 heures de culture, reste le même cytochrome b₁, après 45 heures de culture, sans qu'à aucun moment, le spectre du cytochrome c ne soit décelable. Cette absence d'évolution des pigments hématiniques est corroborée par le fait que l'hémochrome de pyridine des cultures de 12 heures, comme celui des cultures de 20 ou 45 heures, est, dans tous les cas, un hémochrome vert ou blanchâtre, jamais rose.

2°) Cultures en anaérobiose.

Sur les récoltes provenant de culture anaérobie, il n'a été possible, par aucun moyen, de mettre en évidence la présence de composés

T A B L E A U 29

SPECTRE DES CYTOCHROMES, A L'ETAT REDUIT,
OBSERVE CHEZ BACILLUS COAGULANS (I.T.C.C. 11.369)
CULTIVE EN ANAEROBIOSE ET EN AEROBIOSE.

- Préculture de 17 heures sur milieu S.
- 0 = absence de bande d'absorption.
- la longueur d'onde du centre des bandes d'absorption observées est exprimée en μ .

Age des cultures en heures	Cytochrome a				Cytochrome b ₁			
	Examen direct		Hémochrome de pyridine		Examen direct		Hémochrome de pyridine	
	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°
<u>I - Aérobie</u>								
12	603	605	587,5	587,5	561	557	557	558
20	602	604	587,5	587,5	559	560	556,5	555
45	603,5	605	588	588	558,5	558,5	558,5	555
<u>II - Anaérobies</u>								
12	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0

hématiniques. Les examens spectroscopiques directs, à la température ordinaire ou à la température de l'azote liquide, aussi bien que les examens des récoltes traitées à la pyridine (à la température ordinaire ou à -192°) sont tous négatifs, et ceci après 12, 20 ou 45 heures de culture. Ainsi, cultivé en anaérobiose, B. coagulans est dépourvu de cytochrome, et est capable de transformer quantitativement le glucose en acide lactique; ce double caractère le rend très proche des bactéries lactiques vraies.

3°) Cultures semi-aérobies.

Les observations spectroscopiques réalisées sur chacune des nombreuses récoltes semi-aérobies effectuées au cours de ce travail, prêtent aux remarques suivantes :

- quand le milieu de culture liquide remplit presque totalement le récipient qui le contient, (contact réduit avec l'air), et quand le milieu est peu agité, on ne constate aucune bande d'absorption à l'examen spectroscopique direct; mais le traitement par la pyridine donne lieu à la formation d'un hémochrome dont la bande d'absorption est centrée entre 547 μ et 550 μ ;
- quand le milieu de culture liquide n'occupe qu'une petite fraction du volume du récipient et que le milieu est agité assez souvent à la main, on observe, à l'examen direct, une bande unique faible, centrée vers 560 μ : cytochrome b_1 ; la zone rouge du spectre ne contient aucune bande visible; après traitement des bacilles par l'hydrosulfite et la pyridine, on constate l'existence d'une bande paraissant, soit unique (centrée sur 553.5 μ), soit double (centrées à environ 549 et 560 μ). Ces derniers examens n'ont été faits qu'à la température ordinaire.

B - CATALASE.

Au cours de l'identification de la souche C, nous avons été amené à constater que *Bacillus coagulans*, contrairement aux bactéries lactiques vraies, manifestait une activité catalasique. Toutefois l'absence de cytochrome, découverte chez *B. coagulans* quand cet organisme est cultivé en anaérobiose, nous a incité à nous demander si, dans de telles conditions, *B. coagulans* conserve ou ne conserve pas son activité catalasique. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons mesuré l'activité catalasique de *B. coagulans* cultivé en aérobiose, d'une part, et anaérobiose, d'autre part.

- Choix de la méthode utilisée pour mesurer l'activité catalasique -

Il est bien connu que la très faible teneur en catalase des microorganismes et des tissus rend impossible la mise en évidence de ce ferment par des méthodes spectroscopiques. La présence du ferment catalase se décèle par des essais de décomposition de H_2O_2 .

En 1931 A. FUJITA & T. KODAMA ont publié un procédé de détermination manométrique de l'eau oxygénée et un procédé de détermination manométrique de la catalase (35). FUJITA définit l'unité d'activité catalasique de la façon suivante : mm³ d'oxygène libérés (à 0° et 760 mm Hg) en 30 minutes, à 38°, par 1 mg (poids sec) de bactéries, la décomposition totale de l'eau oxygénée devant rester inférieure à 50% de l'eau oxygénée initialement présente. En 1932 VIRTANEN, cité par A. BERTHO (7), définit l'activité catalasique, comme étant le rapport de la constante de vitesse de la réaction $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$, au nombre de cellules vivantes ayant participé à la réaction.

D'autres auteurs ont, d'une manière analogue, défini l'activité catalasique des extraits fermentaires comme le rapport de la constante de vitesse de la réaction, au poids, exprimé en grammes, de la préparation enzymatique contenue dans 50 ml d'essai.

La définition donnée par VIRTANEN nous ayant paru la plus précise dans le cas de l'étude des bacilles entiers, malgré les nombreuses données numériques des travaux de FUJITA & KODAMA qui auraient pu nous paraître d'intéressants termes de comparaison, nous nous sommes arrêtée au procédé préconisé par VIRTANEN.

- Mesure de l'activité catalasique de la souche C provenant de cultures aérobies ou anaérobies.

La détermination de la constante de vitesse de décomposition de l'eau oxygénée par *B. coagulans*, a été faite, à la température de 38°, en solution tampon phosphate à pH 6.4, la quantité initiale d'eau oxygénée étant pour chaque essai (dont le volume liquide est 2 ml) 20 millièmes de millimolécule. Le dégagement d'oxygène, en fonction du temps, montre qu'il dépend d'une réaction monomoléculaire et que l'on peut calculer les constantes de vitesse k de la réaction d'après l'expression classique :

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}, \text{ dans laquelle}$$

a = concentration moléculaire initiale du substrat

x = molécules de substrat décomposées au temps t

t = temps en minutes.

(Tableau 30)

Le tableau 30 donne une série de valeurs de k calculées pendant les 20 ou 30 premières minutes de la réaction; on constate, tout au moins, au début, une bonne constance de ces valeurs. Le rapport de la constante de vitesse au nombre de cellules de *B. coagulans* mises en jeu dans les essais, donne la valeur A de l'activité catalasique.

- cultures aérobies : $A = 1.29.10^{-9}$

- cultures anaérobies : $A = 0.022.10^{-9}$.

On voit que l'activité catalasique des cultures aérobies est 58 fois plus forte que celle des cultures anaérobies.

En ce qui concerne la valeur absolue de l'activité catalasique des cultures aérobies, on peut dire que cette valeur est beaucoup plus élevée que celle d'*Acetobacter suboxydans* : $A = 0.010.10^{-9}$ et de *Mycoderma vini* (21) : $A = 0.042.10^{-9}$ (mesuré en anaérobiose à pH = 6.6), $A = 0.060.10^{-9}$ (mesuré en anaérobiose à pH = 5.5), $A = 0.055.10^{-9}$ (mesuré en aérobiose à pH = 5.5).

Quant à la faible activité catalasique de *B. coagulans* cultivé en anaérobiose, on peut se demander si elle ne traduit pas, ou bien des conditions d'anaérobiose des cultures encore insuffisantes, ou bien une certaine synthèse de ferment catalase durant la récolte bactérienne qui n'a pas été faite à l'abri de l'air. Il convient, de plus, de ne pas oublier que la méthode manométrique de détection de l'activité catalasique est incomparablement plus précise que la méthode spectroscopique de détection des cytochromes.

Les mêmes mesures effectuées avec des bactéries lactiques vraies telles que : *Tom Delbrücki* et *Sbm casei*, confirment le fait bien connu (8) (48), que ces organismes sont totalement dépourvus d'activité catalasique.

Nos expériences sont en désaccord avec celles faites par FUJITA sur les *Entérocoques* (35), et d'après lesquelles le degré d'oxygénation des cultures est sans influence sur la teneur en catalase. Il est bon de remarquer que FUJITA cultivait ses bactéries sur des milieux au sang, autrement dit, sur des milieux apportant, en quelque sorte, préfabriqué, le noyau

hématinique; de plus, il n'est pas certain que les conditions d'anaérobiose réalisées par FUJITA aient été aussi bonnes que celles réalisées dans nos essais effectués en récipients rodés et en atmosphère d'azote hautement purifié (azote R).

GALE (36) considère que les organismes dépourvus de cytochromes sont, souvent aussi, dépourvus de catalase. Nous apportons ici l'exemple d'un organisme très riche en catalase quand son système respiratoire cytochromique atteint son développement maximum et pauvre en catalase quand son système respiratoire cytochromique a apparemment disparu.

TABLEAU 30

TENEUR EN CATALASE DE B. COAGULANS (SOUCHE C).

- Les bacilles sont utilisés à l'état de masses non proliférantes.
- Tampon phosphate = 0,066 M; pH = 6.4. - Atmosphère N₂ (R).
- H₂O₂ initial = 20 millièmes de millimol. par essai de 2 ml. a.
- Température = 38°.

Temps en minutes	O ₂ dégagé en mm ³	x = H ₂ O ₂ décomposée en millièmes de millimol.	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
I - <u>B. coagulans, Souche C, provenant de cultures aérobies : 0,33 mg. (poids sec) par essai.</u>			
2	85	7,6	0,1965
4	154	13,75	0,239
6	188	16,8	0,232
8	209	18,6	0,224
10	219	19,5	0,207
12	230	20,5	0,209
14	232	20,7	0,188
16	235	21,0	0,178
18	238	21,2	0,167
20	240	21,4	0,160
II - <u>B. coagulans, Souche C, provenant de cultures anaérobies : 5 mg. (poids sec) par essai.</u>			
5	65,5	5,85	0,0644
8	86	7,7	0,0579
11	108	9,65	0,0599
14	122	10,9	0,0563
17	131	11,7	0,0516
20	141	12,6	0,0496
23	147	13,1	0,0463
26	153,5	13,7	0,0436
29	159	14,2	0,0426
32	164	14,6	0,0419

CHAPITRE VI

- DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS -

A - CARACTERES GENERAUX DE B. COAGULANS SOUCHE C. A.T.C.C. 11.369 :

La nouvelle souche de B. coagulans, identifiée au cours de ce travail possède, comme il a été dit, tous les caractères définissant les B. coagulans, sauf celui de coaguler le lait. Bien que ce soit sur la propriété de coaguler le lait que HAMMER ait voulu mettre l'accent, en désignant le bacille qu'il a isolé en 1915 (40), l'absence de cette propriété, dans le cas de la souche C, ne suffit pas pour justifier, à l'heure actuelle, son classement dans un autre groupe que celui des B. coagulans.

Il n'est pas possible, notamment, de confondre la souche C avec Tbm Delbrücki, bactérie lactique vraie, qui a aussi les propriétés d'être thermophile, homolactique, et de ne pas attaquer le lactose; en effet :

- 1°) dans des conditions de culture convenables, (cf. SMITH (64)), il est possible de mettre en évidence des spores chez la souche C,
- 2°) l'acide lactique formé, à partir du glucose, est de l'acide L (+) lactique dans le cas de la souche C, alors qu'il est de l'acide D (-) lactique dans le cas de Tbm Delbrücki,
- 3°) la souche C est pourvue de catalase alors que Tbm Delbrücki en est dépourvu,
- 4°) la souche C est pourvue de cystéine-désulphhydrase alors que Tbm Delbrücki en est dépourvu,
- 5°) la souche C, en culture aérobie ou semi-aérobie est pourvue de certains cytochromes alors que Tbm Delbrücki cultivé en semi-aérobiose en est dépourvu.

Rigoureusement homolactique dans certaines conditions, la souche C s'est révélée être, dans d'autres conditions, en particulier sous l'influence de variations de pH du milieu, productrice d'acétyl-méthyl-carbinol. Ce fait souligne, une fois de plus, que les caractères d'une espèce bactérienne n'ont de signification qu'en fonction des circonstances dans lesquelles ils ont été observés.

Les possibilités égales de croissance de la souche C sur un milieu donné, après un temps d'incubation relativement court (18 à 20 H. à 50°), que l'aération soit intense ou que l'atmosphère du milieu soit exempte d'oxygène, montrent que la souche C dispose dans les deux cas de sources d'énergie, utilisables dans la réalisation de ses synthèses, fonctionnant avec un égal rendement. Après 12 H. d'incubation seulement, la vitesse de croissance est beaucoup plus grande en aérobiose qu'en anaérobiose mais, entre la 12^{ème} et la 18-20^{ème} heure, la vitesse de croissance anaérobie dépasse largement la vitesse de croissance aérobie. La chaîne de réactions à laquelle participe l'oxygène moléculaire aurait donc par rapport à la chaîne de réactions à laquelle ne participe pas l'O₂ moléculaire le seul avantage d'accélérer initialement les processus de synthèse.

L'étude de l'acide lactique formé aux dépens des réserves hydrocarbonées intracellulaires par B. coagulans, à l'état de masses non proliférantes, indique, comme chez la levure, que les hydrates de carbone ne sont pas mis en réserve d'une façon identique **suivant que** la croissance des bacilles (durant 20 H. à 50°), a eu lieu en aérobiose ou en anaérobiose: les bacilles provenant de cultures aérobies produisent en atmosphère de CO₂ à partir de leurs réserves hydrocarbonées 2 à 3 fois plus d'acide lactique que ceux provenant de cultures anaérobies. Ces résultats ne permettent pas de dire comment, dans ces deux types de circonstances, les réserves hydrocarbonées diffèrent en qualité ou en quantité. Ils montrent, seulement, que B. coagulans est capable de transformer ses réserves hydrocarbonées en acide lactique en anaérobiose et en aérobiose, alors que les levures ne les attaquent qu'en mettant en jeu leurs mécanismes respiratoires (66). Dans le cas particulier, B. coagulans apparaît comme ayant de plus larges possibilités réactionnelles que la levure.

B - PRESENCE D'UNE CYSTEINE-DESULFHYDRASE FERMENT DE CONSTITUTION CHEZ B. COAGULANS.

Dès 1933, H.L.A. TARR (69) ayant examiné une série d'espèces bactériennes, a montré qu'un certain nombre d'entre elles étaient pourvues d'un ferment intervenant dans la libération de SH₂ à partir de la cystéine et que ce ferment existait indifféremment chez des espèces anaérobies, aéro-
bies facultatives ou aérobie.

Nos expériences permettent de classer les *B. coagulans* parmi les organismes libérant SH_2 de la cystéine. Elles précisent que la cystéine-désulphydrase de *B. coagulans* présente les caractères suivants :

- Elle est, comme chez *Prop. pentosaceum* (25)(78)(24) et comme chez *B. subtilis* (34)(70) un ferment de constitution et non un ferment d'adaptation comme chez *E. coli* (24)(32);
- la synthèse de ce ferment n'est pas accrue par addition de pyridoxine dans le milieu;
- toutes choses égales d'ailleurs, l'activité désulfurante de *B. coagulans* est du même ordre que celle de *Prop. pentosaceum*, et très inférieure à celle de *B. subtilis* (aérobie strict) ou de *E. coli* adapté;
- la réaction de désulfuration est une réaction équilibrée (comme dans le cas de *Prop. pentosaceum* et de *B. subtilis*) et non totale comme dans le cas de *E. coli*;
- la réaction est inhibée par l'acide pyruvique et le 2-octanol;
- la réaction est accélérée par l'oxygène.

Le tableau 31 donne les caractères comparatifs des systèmes désulfurants de *B. coagulans*, de *Prop. pentosaceum*, de *B. subtilis* et de *E. coli*.

(Tableau 31)

La recherche des variations de l'activité désulphydrase de *B. coagulans*, cultivé en aérobiose et pourvu d'un système de ferment hématinique comportant notamment catalase, cytochrome a et b_1 , ou cultivé en anaérobiose et dépourvu presque totalement de ses ferments hématiniques (teneur en catalase environ 58 fois inférieure à la teneur aérobie, teneur en cytochromes nulle), a révélé que, dans des essais non additionnés de glucose, les bacilles issus de cultures aérobies ont une activité désulfurante, mesurée soit en atmosphère de CO_2 soit en atmosphère ($50\% \text{O}_2 + 50\% \text{CO}_2$), égale ou supérieure à celle des bacilles issus de cultures anaérobies (tableau 27) et que, dans des essais additionnés de glucose, les bacilles issus de cultures aérobies ont une activité désulfurante plus élevée en atmosphère de CO_2 qu'en atmosphère de ($50\% \text{CO}_2 + 50\% \text{O}_2$).

Il apparaît donc que *B. coagulans* a une aptitude à synthétiser la cystéine-désulphydrase sensiblement égale, dans des conditions de croissance aérobies ou anaérobies, et que la présence d'oxygène dans les essais

T A B L E A U 31

COMPARAISON ENTRE LES SYSTEMES DESULFURANTS DE B. COAGULANS
ET DE QUELQUES AUTRES MICROORGANISMES.

	<u>B. coagulans</u>	<u>Propioni- bacterium pentosaceum</u> (25) (78)	<u>B. subtilis</u> (34) (70)	<u>E. coli</u> (24) (32)
Cystéine- désulphydrase	ferment de constitution	ferment de constitution	ferment de constitution	ferment d'adaptation
$\text{CO}_2^{(o)}$ Q_{SH_2}	1,45	1,5	15	0,16 25
effet du glucose	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$ fortement	$\searrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$
Réaction équilibrée ou totale	équilibrée	équilibrée	équilibrée	totale
Spécificité optique	?	nulle	pour L cystéine	pour L cystéine
effet de l'oxygène	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$	?	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$	$\nearrow \text{Q}_{\text{SH}_2}$
effet de l'acide pyruvique	inhibition	inhibition	?	?
Cystine réductase	+	+	0	+

(o) essais de désulfuration de la L cystéine en présence de glucose dans des récipients clos.

de désulfuration ne freine pas la réaction. Ces expériences représentent la première tentative faite en vue d'apprécier les variations de l'activité désulfurante d'un organisme aérobie facultatif, cultivé dans des conditions définies d'aérobiose ou d'anaérobiose.

Il n'est pas possible, pour l'instant, de donner une explication du rôle activateur du glucose et de l'oxygène dans les essais de désulfuration de la cystéine.

C - INDUCTION PAR L'OXYGENE DES FERMENTS HEMATINIQUES DE B. COAGULANS.

Une des conclusions les plus importantes de ce travail est que *B. coagulans*, cultivé en aérobiose, est riche en ferments hématiniques (catalase, cytochromes b_1 et a) alors que, cultivé en anaérobiose, il devient totalement dépourvu de cytochromes et pauvre en catalase. A ce propos plusieurs points méritent d'être discutés :

On peut se demander tout d'abord si les méthodes que nous avons utilisées justifient pleinement de telles conclusions.

- La teneur en catalase des bacilles, a été évaluée d'après des mesures manométriques d'activité catalasique particulièrement précises et sensibles. La valeur trouvée, dans le cas de bacilles issus de cultures anaérobies est faible, 58 fois plus faible que celle trouvée dans le cas de bacilles issus de cultures aérobies. Toutefois, le fait que cette valeur n'est pas nulle nous autorise-t-il à dire avec certitude que la synthèse du ferment catalase est possible en l'absence d'oxygène ? Nous ne le pensons pas car il n'est pas exclu que cette faible quantité de catalase ait eu le temps de se former pendant la durée des récoltes bactériennes que nous n'avons jamais réalisées en nous plaçant rigoureusement à l'abri de l'air. La seule chose sûre c'est qu'une forte synthèse du ferment catalase n'a lieu qu'en aérobiose.

- Quant à la teneur en cytochromes des bacilles, elle a été appréciée par des examens spectroscopiques de pâtes bactériennes. La faible teneur en cytochromes des cellules vivantes d'une part, les importants phénomènes de diffusion de la lumière d'autre part, rendent cette méthode beaucoup moins sensible que la méthode de détermination manométrique de l'activité catalasique. Cependant nous avons amélioré ce moyen d'investigation, d'une part, en recherchant systématiquement, après traitement des bacilles par l'hydrosulfite et la pyridine, le spectre de l'hémochrome de

pyridine toujours plus net que celui des cytochromes eux-mêmes et, d'autre part, en examinant le spectre de nos préparations, traitées ou non par l'hydrosulfite et la pyridine, non seulement à la température ordinaire (environ 20°), mais aussi à la température de l'azote liquide (- 192°). On sait (43) qu'à ces très basses températures les bandes d'absorption s'amincissent, se renforcent, s'accroissent d'une façon considérable et telle que l'absence totale de spectre dans le cas d'une pâte bactérienne, traitée par hydrosulfite et pyridine et examinée sous une épaisseur de 3 mm à - 192° semble bien correspondre à une absence totale de cytochromes. L'absence de cytochromes ainsi définie est constatée dans toutes les cultures anaérobies de *B. coagulans*, souche C. Les cultures semi-aérobies, souvent dépourvues de spectres hématiniques directement visibles, présentent toujours un spectre d'hémochrome de pyridine, net à la température ordinaire et accentué à - 192°. Les cultures fortement aérobies, enfin, présentent, à l'examen direct, les bandes d'absorption α des cytochromes a et b_1 dont la netteté se renforce à la température de - 192°, et aussi, après traitement par l'hydrosulfite et la pyridine, les spectres des hémochromes de pyridine correspondants, très nets aussi bien à la température de 20° qu'à la température de - 192°.

Ainsi donc, étant donné nos moyens d'investigations, nous pouvons dire d'une façon générale que les cultures anaérobies de *B. coagulans* ne contiennent aucun cytochrome; que les cultures semi-aérobies contiennent le cytochrome b_1 et ne contiennent ni le cytochrome a , ni le cytochrome c ; que les cultures aérobies contiennent le cytochrome a et le cytochrome b_1 . Dans aucun cas il ne nous a été possible de distinguer la bande d'absorption du cytochrome c ou de son hémochrome de pyridine, même à la température de l'azote liquide. On ne retrouve pas chez *B. coagulans* une évolution du système cytochromique en fonction de l'âge de la culture aboutissant à la formation d'un système cytochromique complet $a b c$ comme chez *B. subtilis* (19); les cultures aérobies les plus vieilles que nous ayons observées restaient dépourvues de cytochrome c .

Deux conclusions ressortent de ces considérations : la première c'est que la synthèse des cytochromes de *B. coagulans* est fonction de la présence d'oxygène dans le milieu et même est étroitement liée au degré d'aération des cultures cf. (28)(62); la seconde c'est que *B. coagulans* représente un exemple remarquable d'un organisme capable de poursuivre

son métabolisme et sa croissance indifféremment en faisant intervenir ou non les ferments hématiniques de respiration. Le fait que *B. coagulans* semble pouvoir se passer complètement de pigments hématiniques rend plus obscure encore la signification physiologique de ces ferments.

Comme nos expériences ne comportent aucun essai d'extraction chimique des composés hématiniques, elles ne permettent pas d'affirmer que les cellules de *B. coagulans* issues de cultures anaérobies ne contiennent pas des molécules proche précurseurs des pigments hématiniques et ne permettent pas non plus d'affirmer que la synthèse complète du noyau hématinique par *B. coagulans* est impossible sans intervention de l'oxygène moléculaire.

D - RELATIONS ENTRE PHENOMENES DE RESPIRATION ET DE DESULFURATION.

Il est surprenant à priori que *Tbm Delbrücki* (bactérie thermophile, homolactique, dépourvue de catalase et de cytochromes) ne désulfure pas la cystéine alors que *B. coagulans*, même cultivé en aérobiose et pourvu de catalase et de cytochromes, présente un système enzymatique de désulfuration. On retrouve là cette apparente incompatibilité déjà signalée dans le cas de *Prop. pentosaceum* (16)(17) et de *B. subtilis* (18) : existence d'un système libérant SH_2 , substance inhibitrice du ferment respiratoire de WARBURG, et existence d'un système respiratoire hématinique.

La coexistence d'un système de désulfuration capable de libérer dans le milieu des quantités d'hydrogène sulfuré pouvant atteindre ou dépasser une concentration 10^{-3}M (susceptible d'inhiber de 100 % le "ferment respiratoire") d'une part, et d'un système respiratoire hématinique d'autre part, ne semble pouvoir s'expliquer qu'en admettant l'intervention d'une oxydase insensible à SH_2 , autre que le "ferment respiratoire de WARBURG".

On ignore si "l'effet Pasteur" se manifeste chez *B. coagulans* et on ignore aussi si cet "effet Pasteur" serait, comme dans le cas de *Prop. pentosaceum* (16), sensible à SH_2 . De telles recherches particulièrement difficiles à réaliser sur *B. coagulans* n'ont pas été faites.

Il n'est pas permis jusqu'ici d'émettre une hypothèse relative au rôle éventuellement joué par le SH_2 libéré, qui n'est peut-être qu'un produit de déchet n'interférant avec aucune réaction.

VII - L'étude de la désulfuration de la cystine par *B. coagulans* 11.369 révèle la présence d'une cystine-réductase.

VIII - Toutes choses égales d'ailleurs, la vitesse de désulfuration de la L cystéine (Q_{SH_2}) par *B. coagulans* 11.369 à l'état de masses non proliférantes, prend les valeurs moyennes suivantes en fonction de la présence d'oxygène dans les cultures ou dans les essais;

Bacilles provenant de cultures :	Q_{SH_2}			
	Essais de désulfuration ^(°) en atmosphère de			
	CO ₂		(50% O ₂ + 50% CO ₂)	
	sans glucose	+ glucose	sans glucose	+ glucose
anaérobies	1.70	2.4	1.6	4.2
aérobies	1.70	1.9	3.5	3.5
(°) avec barbotage de gaz et extraction continue de SH ₂ .				

IX - Pour la première fois il est montré que *B. coagulans* cultivé en aérobiose possède un système respiratoire comprenant les cytochromes a et b₁ et que *B. coagulans* cultivé en anaérobiose est dépourvu de système respiratoire cytochromique.

X - La mesure de la teneur en catalase de *B. coagulans* 11.369 montre qu'elle est au moins 58 fois plus élevée si les bacilles proviennent de cultures aérobiees que s'ils proviennent de cultures anaérobies.

XI - La discussion des résultats obtenus dans cette étude sur *B. coagulans* fait ressortir :

a) que la présence d'oxygène dans les cultures ou les essais n'inhibe ni la synthèse de la cystéine-désulphydrase, ni son activité mais a, au contraire, dans certains cas, tendance à l'accroître notablement;

b) que l'incompatibilité entre présence de SH₂ et fonctionnement d'une oxydase type "ferment respiratoire de WARBURG" rend vraisemblable chez cet organisme, comme chez *Prop. pentosaceum*, l'existence d'une oxydase insensible à SH₂.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - M.B. ALLEN - Bact. Rev. 17 (1953) 125.
- 2 - A.A. ANDERSEN & C.H. WERKMAN - Iowa State Coll. J. Sci. 14 (1940) 187.
- 3 - R.M. AZARKH & V.N. GLADKOVA - Doklady Akad. Nauk S.S.S.R. 85 (1952) 173.
- 4 - M.E. BECKER & C.S. PEDERSON - J. Bact. 59 (1950) 717.
- 5 - Bergey's manual of determinative bacteriology 6th ed. Williams & Wilkins CO., Baltimore - 1948.
- 6 - R.N. BERRY - J. Bact. 25 (1933) 72.
- 7 - A. BERTHO - Ergebnisse der Enzymforschung 1 (1932) 231.
- 8 - A. BERTHO & H. GLUCK - Liebigs Ann. der Chem. 494 (1932) 159.
- 9 - F. BINKLEY - J. Biol. Chem. 150 (1943) 261.
- 10 - F. BINKLEY & D. OKESON - J. Biol. Chem. 182 (1950) 273.
- 11 - E. BOREK & H. WAELSCH - J. Biol. Chem. 190 (1951) 191.
- 12 - A.E. BRAUNSTEIN & R.M. AZARKH - Doklady. Nauk. S.S.S.R. 71 (1950) 93.
- 13 - A.E. BRAUNSTEIN & E.V. GORYACHENKOVA -
Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. 71 (1950) 93
74 (1950) 529.
- 14 - M.N. CAMIEN & M.S. DUNN - J. Biol. Chem. 182 (1950) 119
185 (1950) 553.
- 15 - L. CAMPBELL & O.B. WILLIAMS - J. Bact. 65 (1953) 146.
- 16 - P. CHAIX-AUDEMARD - Thèse Sciences 1940 LYON.
"Sur les relations existant entre respiration et fermentation
chez Propionibacterium pentosaceum".
- 17 - P. CHAIX & C. FROMAGEOT - Bull. Soc. Chim. Biol. 24 (1942) 1125.
- 18 - P. CHAIX & TCHEN PAU KIUN - Bull. Soc. Chim. Biol. 25 (1943) 1374.
- 19 - P. CHAIX & G. RONCOLI - Biochim. Biophys. Acta, 6 (1950) 268.
- 20 - P. CHAIX & P. FLAMENS - Biochim. Biophys. Acta, 8 (1950) 38.
11 (1953) 530.
- 21 - J. CHAUVET - Enzymologia 11 (1943) 57.
- 22 - R.E. CLEVERDON & M.C. PELCZAR, J. & R.N. DOETSCH -
J. Bact. 58 (1949) 523.
- 23 - J.G. DAVIS - Biochem. Z. 265 (1933) 90
267 (1933) 357.
- 24 - P. DESNUELLE & C. FROMAGEOT - Enzymologia 6 (1939) 80, 242, 387.
- 25 - P. DESNUELLE, E.A. WOKEY & C. FROMAGEOT - Enzymologia 8 (1940) 225.
- 26 - R. DUBOS - Bacterial Cell - Harvard Univ. Press. 1947.

- 27 - C.H. DUMAZERT - Thèse pharmacie 1936 MARSEILLE -
"Sur le microdosage iodométrique des aldoses et son application au dosage de la glycémie".
- 28 - B. EPHRUSSI & P. SLONIMSKI - Biochim.Biophys.Acta 6 (1950) 256.
- 29 - T.E. FRIEDEMANN, M. COTONIO & P.A. SHAFFER - J.Biol.Chem. 73 (1927) 335.
- 30 - T.E. FRIEDEMANN & J.B. GRAESER - J. Biol. Chem. 100 (1933) 291.
- 31 - T.E. FRIEDEMANN & A.J. KENDALL - J. Biol. Chem. 82 (1929) 23.
- 32 - C. FROMAGEOT, P. DESNUELLE & L GRAND -
Bull.Soc.Chim.Biol. 25 (1943) 1227
26 (1944) 1001.
- 33 - C. FROMAGEOT & R. GRAND - Enzymologia 11 (1943) 81
11 (1944) 235.
- 34 - C. FROMAGEOT & TCHEN PAU KIUN - Bull.Soc.Chim.Biol. 23 (1941) 1471
25 (1943) 1006-1141.
- 35 - A. FUJITA & T. KODAMA - Biochem.Z. 232 (1931) 15 et 20.
- 36 - E.F. GALE - The Chemical Activities of Bacteria - Univ. Tutorial Press 1942.
- 37 - E.R.L. GAUGHRAN - Bact. Rev. 11 (1947) 189.
- 38 - R.E. GORDON & N.R. SMITH - J. Bact. 58 (1949) 327.
- 39 - N. GRELET - Thèse Sciences 1951 PARIS -
"Le déterminisme de la sporulation chez Bacillus megatherium".
- 40 - B.W. HAMMER - Iowa Agr. Exp. St. Res. Bull. 19 (1915) 119.
- 41 - R.E. KALLIO & J.R. PORTER - J. Bact. 60 (1950) 607.
- 42 - R.E. KALLIO - J. Biol. Chem. 192 (1951) 371.
- 43 - D. KEILIN & E.F. HARTREE - Nature 164 (1949) 254.
- 44 - W. KEMPNER - J. of Cell. and Comp. physiology 10 (1937) 339.
- 45 - B. KNIGHT & H. PROOM - J. Gen. Microbiol. 4 (1950) 508.
- 46 - M. LANGERON - Précis de Microscopie - Masson & Cie Ed. 1942.
- 47 - Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria.
Edited by the Committee on Bacteriological Technic of the Society of American Bacteriologists (1946).
- 48 - O. MEYERHOFF & P. FINKLE - Chem. der Zelle Gewebe 12 (1925) H.2.
- 49 - O. MEYERHOFF & W. SCHULZ - Biochem.Z. 250 (1932) 35.
- 50 - C. NEUBERG & G. GORR - Biochem. Z. 173 (1926) 476.
- 51 - C. OPPENHEIMER - Die Methodik der Fermente - 3 (1929) 1259.

- 52 - S. ORLA-JENSEN - The Lactic Acid Bacteria - Ejnar Munksgaard -
COPENHAGUE (1943).
- 53 - L. PASTEUR - Etudes sur la bière - PARIS 1876.
- 54 - C.S. PEDERSON - Bact. Rev. 16 (1952) 227.
- 55 - J.S. POWELL & P.C. JOY - Anal. Chem. 21 (1949) 296.
- 56 - J.H. QUASTEL & M.D. WHETHAM - Biochem.J. 19 (1925) 520.
- 57 - A. REID - Biochem.Z. 242 (1931) 159.
- 58 - W.H. RIESEN, B.S. SCHWEIGERT & C.A. ELVEHJEM. J. Biol. Chem. 165
(1946) 347.
- 59 - W.B. SARLES, B.W. HAMMER - J. Bact. 23 (1932) 301.
- 60 - C. SCHLAYER - J. Bact. 31 (1936) 181.
- 61 - P.A. SHAFFER & A.F. HARTMANN - J. Biol. Chem. 45 (1921) 349.
- 62 - P.P. SLONIMSKI - Thèse Sciences Naturelles - 1952 - PARIS.
"Recherches sur la formation des enzymes respiratoires
chez la levure".
- 63 - N.R. SMITH - J. Bact. 39 (1940) 97 et 757.
- 64 - N.R. SMITH, R.E. GORDON & F.E. CLARK - Bureau of Plant Industry,
Soils and Agricultural Engineering - (Miscellaneous Publica-
tion 559 M) Mai 1946.
- 65 - R.M. STERN, C.P. HEGARTY & O.B. WILLIAMS - Food Research 7 (1942)
186.
- 66 - T.J.B. STIER, M.I. NEWTON & H. SPRINCE - Science 89 (1939) 85.
- 67 - T.J.B. STIER, H.S. SPRINCE - J. Cell. Comp. Physiol. 18 (1941) 135.
- 68 - H.R. STILES, W.H. PETERSON & E.B. FRED - J. Bact. 12 (1926) 427.
- 69 - H.L.A. TARR - Biochem.J. 27 (1933) 759, 1869.
- 70 - TCHEN PAU KIUN - Thèse Sciences 1944 LYON -
"Désulfuration de la cystéine par *B. subtilis*".
- 71 - L. TRIBONDEAU - C.R. Soc. Biol. 80 (1917) 880.
- 72 - L. TRIBONDEAU & J. DUBREUIL - C.R. Soc. Biol. 80 (1917) 331.
- 73 - O. WARBURG, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten,
Werner Saenger, Berlin 1946, p. 26, 79.
- 74 - O. WARBURG - Naturwissenschaften Heft 1 - 5 (1933) 493.
- 75 - G.C. WARE - J. Gen. Microbiol. 5 (1951) 880.
- 76 - C.H. WERKMAN & A.A. ANDERSEN - J. Bact. 35 (1938) 69.

77 - O.B. WILLIAMS, C. LAMANNA, G. KNAYSI, E.S. WYNNE, C.F. SCHMIDT,
H.R. CURRAU, M. LEVINE, H. SUGIYAMA, H. REYNOLDS, H. LICHTENSTEIN,
Ch.R. PHILLIPS - Bact.Rev. 16 (1952) 89.

78 - E.A. WOOKEY - Thèse Sciences - 1940 LYON -

"Contribution à l'étude de la dégradation biologique de
la cystéine et des corps voisins".

-O-O-O-O-O-O-

TABLES DES MATIERES

	<u>Pages</u>
- INTRODUCTION	1
- <u>CHAPITRE I</u> : MATERIEL & TECHNIQUES	5
A. Souches bactériennes utilisées	5
B. Milieux de cultures	5
C. Examens morphologiques	11
D. Méthode de caractérisation bactériologique de la souche C	12
E. Procédés d'étude de diverses activités ferment- taires de B. coagulans utilisé sous forme de "resting bacteria"	12
F. Identifications chimiques et dosages	15
G. Procédés d'étude des cytochromes	16
- <u>CHAPITRE II</u> : ETUDE BACTERIOLOGIQUE ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE C : B. COAGULANS A.T.C.C. 11.369 ...	17
Appendice : A propos des exigences nutritives de B. coagulans, souche C	34
- <u>CHAPITRE III</u> : CROISSANCE DE B. COAGULANS, SOUCHE C EN FONCTION DU DEGRE D'AERATION DES CULTURES; QUAN- TITE D'ACIDE LACTIQUE FORME PAR LES "RESTING BACTERIA" OBTENUES DANS CES DIFFERENTES CONDITIONS	41
A. Evaluation de la croissance dans des milieux fortement aérés, faiblement aérés ou totalement exempts d'oxygène	41
B. Production d'acide lactique à partir des réserves hydrocarbonées des masses bactériennes non proli- férantes	42
C. Dégradation du glucose et de quelques autres substances hydrocarbonées par la souche C à l'état de masses non proliférantes; action inhi- bitrice de l'alcool octylique	45

	<u>Pages</u>
D. Dégradation du glucose en acide lactique par la souche C à l'état de masses non proliférantes en présence de L cystéine	50
 - <u>CHAPITRE IV</u> : MISE EN EVIDENCE D'UNE CYSTEINE-	
DESULFHYDRASE CHEZ B. COAGULANS; CARACTERES DE CE SYSTEME FERMENTAIRE EN FONCTION NOTAMMENT DE LA PRESENCE D'OXYGENE DANS LES CULTURES ET DANS LES ESSAIS	51
A. Recherche de l'activité cystéine-désulfhydrase chez différents organismes homolactiques	51
B. Caractères de la désulfhydrase de B. coagulans étudiée sur des bacilles issus de cultures semi-aérobies	54
a) Désulfuration de la L cystéine en atmosphère de CO ₂ (récipients clos)	54
b) Désulfuration de la L et DL cystine en atmosphère de CO ₂ (récipients clos)..	62
c) Désulfuration de molécules soufrées autres que cystéine et cystine	66
C. Activité désulfurante de B. coagulans provenant de cultures aérobies ou anaérobies	66
a) Désulfuration de la L cystéine étudiée en atmosphère CO ₂	66
b) Désulfuration de la L cystéine étudiée en atmosphère (50 % O ₂ + 50 % CO ₂) ...	68
D. Apport exogène de pyridoxine et activité désulfhydrase	68
 - <u>CHAPITRE V</u> : FERMENTS HEMATINIQUES DE B. COAGULANS	
CULTIVE EN AEROBIOSE OU EN ANAEROBIOSE	73
A. Cytochromes	73
B. Catalase	76
- <u>CHAPITRE VI</u> : DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS	81
A. Caractères généraux de B. coagulans, souche C, A.T.C.C. 11.369	81

	<u>Pages</u>
B. Présence d'une cystéine-désulphydrase, ferment de constitution, chez B. coagulans ...	82
C. Induction par l'oxygène des ferments hématiniques de B. coagulans	85
D. Relations entre respiration et désulfuration chez B. coagulans	87
- RESUME & CONCLUSIONS	88
- BIBLIOGRAPHIE	90
- TABLE DES MATIERES	94

—oooOOooo—

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

DONNEES RECENTES SUR LA STRUCTURE SUBMICROSCOPIQUE
DE LA CELLULE BACTERIENNE, FOURNIES PAR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Vu :

Les Membres du Jury,

D. CORDIER

R. KÜHNER

P. CHAIX

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

DOUIN

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 5 Mars 1954

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

André ALLIX

